

5P04/04335

PCT/JP2004/004385

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

26. 3. 2004

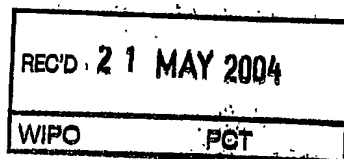
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application: 2003年 7月31日

出 願 番 号  
Application Number: 特願2003-284559  
[ST. 10/C]: [JP2003-284559]

出 願 人  
Applicant(s): 株式会社インテレクチャル・プロパティ・コンサルティング



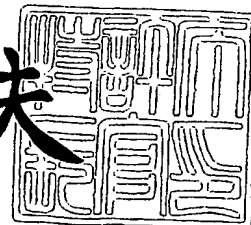
PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

BEST AVAILABLE COPY

2004年 4月30日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今井康夫



出証番号 出証特2004-3037412

【書類名】 特許願  
【整理番号】 J103573332  
【提出日】 平成15年 7月31日  
【あて先】 特許庁長官 殿  
【国際特許分類】 C04B 24/14  
【発明者】  
    【住所又は居所】 大阪府豊中市新千里北町 2 丁目 9 番 3 号  
    【氏名】 遠山 正彌  
【発明者】  
    【住所又は居所】 大阪府箕面市小野原東 6 丁目 2 5 - 2 - 3 0 3  
    【氏名】 山下 俊英  
【特許出願人】  
    【識別番号】 302044546  
    【氏名又は名称】 株式会社トランスサイエンス  
【代理人】  
    【識別番号】 100078282  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 山本 秀策  
【選任した代理人】  
    【識別番号】 100062409  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 安村 高明  
【選任した代理人】  
    【識別番号】 100113413  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 森下 夏樹  
【先の出願に基づく優先権主張】  
    【出願番号】 特願2003- 92923  
    【出願日】 平成15年 3月28日  
【先の出願に基づく優先権主張】  
    【出願番号】 特願2003-125681  
    【出願日】 平成15年 4月30日  
【手数料の表示】  
    【予納台帳番号】 001878  
    【納付金額】 21,000円  
【提出物件の目録】  
    【物件名】 特許請求の範囲 1  
    【物件名】 明細書 1  
    【物件名】 図面 1  
    【物件名】 要約書 1  
    【包括委任状番号】 0210954

**【書類名】 特許請求の範囲****【請求項 1】**

神経を再生するための方法であって、p 7 5 シグナル伝達経路を阻害する工程を含む、方法。

**【請求項 2】**

前記 p 7 5 シグナル伝達経路は、神経再生が所望される部位における神経細胞のものである、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 3】**

前記 p 7 5 シグナル伝達経路の阻害は、p 7 5 シグナル伝達経路における伝達因子もしくはその改変体もしくはフラグメント、または p 7 5 シグナル伝達経路における伝達因子に対して特異的に相互作用する因子を再生に有効な量で提供することによる、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 4】**

前記 p 7 5 シグナル伝達経路における伝達因子は、MAG、PKC、IP<sub>3</sub>、GTP<sub>1b</sub>、p 7 5、Rho GDI、Rho、p 2 1 および Rho キナーゼからなる群より選択される少なくとも 1 つの伝達因子を含む、請求項 3 に記載の方法。

**【請求項 5】**

前記 p 7 5 シグナル伝達経路の阻害は、MAG と GTP<sub>1b</sub> との相互作用の阻害、PKC の阻害、IP<sub>3</sub> の活性化、GTP<sub>1b</sub> と p 7 5 との相互作用の阻害、p 7 5 と Rho との相互作用の阻害、p 7 5 と Rho GDI との相互作用の阻害、Rho と Rho GDI との相互作用の維持または強化、Rho GDP から Rho GTP への変換阻害、Rho と Rho キナーゼとの相互作用の阻害および Rho キナーゼの活性阻害からなる群より選択される、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 6】**

前記 p 7 5 シグナル伝達経路の阻害は、MAG と GTP<sub>1b</sub> との相互作用を抑制または消失する因子、PKC の阻害因子、IP<sub>3</sub> の活性化因子、GTP<sub>1b</sub> と p 7 5 との相互作用を抑制または消失する因子、p 7 5 と Rho GDI との相互作用を抑制または消失する因子、p 7 5 と Rho との相互作用を抑制または消失する因子、Rho と Rho GDI との相互作用を維持または強化する因子、Rho GDP から Rho GTP への変換を阻害する因子、Rho と Rho キナーゼとの相互作用を阻害する因子、および Rho キナーゼの活性を阻害する因子からなる群より選択される少なくとも 1 つの因子を再生に有効な量で提供することによる、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 7】**

前記神経の再生は、インビボまたはインビトロで行われる、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 8】**

前記神経は、脊髄損傷、脳血管障害または脳外傷を含む状態にある、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 9】**

前記 p 7 5 シグナル伝達経路を阻害する工程は、再生に有効な量の、Pep 5 ポリペプチド、Pep 5 ポリペプチドをコードする核酸分子、PKC の阻害因子、IP<sub>3</sub> の活性化因子、p 7 5 ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、p 7 5 ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、p 7 5 細胞外ドメインポリペプチド、p 7 5 細胞外ドメインポリペプチドをコードする核酸分子、Rho GDI ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、Rho GDI ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、Rho GDI ポリペプチドをコードする核酸分子、MAG ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、MAG ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、p 2 1 ポリペプチド、p 2 1 をコードする核酸分子、Rho ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、Rho ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、Rho キナーゼに対して特異的に相互作用する因子および Rho キナーゼをコー

ドする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子ならびにその改変体およびフラグメントからなる群より選択される少なくとも1つの分子を含む組成物を該神経に与える工程、を包含する、請求項1に記載の方法。

【請求項10】

前記因子は、PTDドメインに結合する、請求項4に記載の方法。

【請求項11】

神経疾患、神経障害および/または神経の状態を、処置、予防、診断または予後する方法であって、該処置、予防、診断または予後を必要とするかまたはそのことが予想される被検体においてp75シグナル伝達経路を調節する工程を包含する、方法。

【請求項12】

前記p75シグナル伝達経路を調節する工程は、p75シグナル伝達経路における伝達因子もしくはその改変体もしくはフラグメント、またはp75シグナル伝達経路における伝達因子に対して特異的に相互作用する因子を再生に有効な量で、前記処置、予防、診断または予後を必要とするかまたはそのことが予想される被検体に投与する工程を包含する、請求項11に記載の方法。

【請求項13】

前記p75シグナル伝達経路における伝達因子は、MAG、PKC、IP<sub>3</sub>、GTPb、p75、RhogDI、Rhog、p21およびRhokinaseからなる群より選択される少なくとも1つの伝達因子を含む、請求項11に記載の方法。

【請求項14】

前記p75シグナル伝達経路の調節は、前記処置、予防、診断または予後を必要とするかまたはそのことが予想される被検体における、MAGとGTPbとの相互作用の阻害、PKCの阻害、IP<sub>3</sub>の活性化、GTPbとp75との相互作用の阻害、p75とRhogとの相互作用の阻害、p75とRhogDIとの相互作用の阻害、RhogとRhogDIとの相互作用の維持または強化、RhogDPからRhogTPへの変換阻害、RhogとRhokinaseとの相互作用の阻害およびRhokinaseの活性阻害からなる群より選択される調節を少なくとも1つ包含する、請求項11に記載の方法。

【請求項15】

前記p75シグナル伝達経路の調節は、MAGとGTPbとの相互作用を抑制または消失する因子、PKCの阻害因子、IP<sub>3</sub>の活性化因子、GTPbとp75との相互作用を抑制または消失する因子、p75とRhogDIとの相互作用を抑制または消失する因子、p75とRhogとの相互作用を抑制または消失する因子、RhogとRhogDIとの相互作用を維持または強化する因子、RhogDPからRhogTPへの変換を阻害する因子、RhogとRhokinaseとの相互作用を阻害する因子、およびRhokinaseの活性を阻害する因子からなる群より選択される少なくとも1つの因子を再生に有効な量で、前記処置、予防、診断または予後を必要とするかまたはそのことが予想される被検体に投与する工程を包含する、請求項11に記載の方法。

【請求項16】

前記神経の再生は、インビボまたはインビトロで行われる、請求項11に記載の方法。

【請求項17】

前記神経は、脊髄損傷、脳血管障害または脳外傷を含む状態にある、請求項11に記載の方法。

【請求項18】

前記p75シグナル伝達経路を調節する工程は、診断、予防、処置または予後に有効な量のPep5ポリペプチド、Pep5ポリペプチドをコードする核酸分子、PKCの阻害因子、IP<sub>3</sub>の活性化因子、p75ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、p75ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、p75細胞外ドメインポリペプチド、p75細胞外ドメインポリペプチドをコードする核酸分子、RhogDIポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、RhogDIポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、RhogDIポリペプチド



ド、R h o G D I ポリペプチドをコードする核酸分子、M A G ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、M A G ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、p 2 1 ポリペプチド、p 2 1 をコードする核酸分子、R h o ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、R h o ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、R h o キナーゼに対して特異的に相互作用する因子および R h o キナーゼをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子ならびにその改変体およびフラグメントからなる群より選択される少なくとも 1 つの分子を含む組成物を該神経に与える工程、  
を包含する、請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 9】

さらに、1 以上のさらなる薬剤を提供する工程を包含する、請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 2 0】

前記因子は、P T D ドメインに結合する、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 2 1】

p 7 5 シグナル伝達経路を阻害する因子を含む、神経を再生するための組成物。

【請求項 2 2】

前記 p 7 5 シグナル伝達経路を阻害する因子は、神経再生が所望される部位における神経細胞に送達されるのに適切な形態である、請求項 2 1 に記載の組成物。

【請求項 2 3】

前記 p 7 5 シグナル伝達経路を阻害する因子は、p 7 5 シグナル伝達経路における伝達因子もしくはその改変体もしくはフラグメント、または p 7 5 シグナル伝達経路における伝達因子に対して特異的に相互作用する因子を含む、請求項 2 1 に記載の組成物。

【請求項 2 4】

前記 p 7 5 シグナル伝達経路における伝達因子は、M A G、P K C、I P<sub>3</sub>、G T 1 b、p 7 5、R h o G D I、R h o、p 2 1 および R h o キナーゼからなる群より選択される少なくとも 1 つの伝達因子を含む、請求項 2 3 に記載の組成物。

【請求項 2 5】

前記 p 7 5 シグナル伝達経路を阻害する因子は、M A G と G T 1 b との相互作用の阻害、P K C の阻害、I P<sub>3</sub> の活性化、G T 1 b と p 7 5 との相互作用の阻害、p 7 5 と R h o との相互作用の阻害、p 7 5 と R h o G D I との相互作用の阻害、R h o と R h o G D I との相互作用の維持または強化、R h o G D P から R h o G T P への変換阻害、R h o と R h o キナーゼとの相互作用の阻害および R h o キナーゼの活性阻害からなる群より選択される少なくとも 1 つの作用を有する、請求項 2 1 に記載の組成物。

【請求項 2 6】

前記 p 7 5 シグナル伝達経路を阻害する因子は、M A G と G T 1 b との相互作用を抑制または消失する因子、P K C の阻害因子、I P<sub>3</sub> の活性化因子、G T 1 b と p 7 5 との相互作用を抑制または消失する因子、p 7 5 と R h o G D I との相互作用を抑制または消失する因子、p 7 5 と R h o との相互作用を抑制または消失する因子、R h o と R h o G D I との相互作用を維持または強化する因子、R h o G D P から R h o G T P への変換を阻害する因子、R h o と R h o キナーゼとの相互作用を阻害する因子、および R h o キナーゼの活性を阻害する因子からなる群より選択される少なくとも 1 つの因子を含み、該前記 p 7 5 シグナル伝達経路を阻害する因子は、再生に有効な量で存在する、請求項 2 1 に記載の組成物。

【請求項 2 7】

インビボまたはインビトロでの投与形態に適切である、請求項 2 1 に記載の組成物。

【請求項 2 8】

前記神経は、脊髄損傷、脳血管障害または脳外傷を含む状態にある、請求項 2 1 に記載の組成物。

【請求項 2 9】

前記 p 7 5 シグナル伝達経路を阻害する因子は、P e p 5 ポリペプチド、P e p 5 ポリペ

プチドをコードする核酸分子、PKCの阻害因子、IP<sub>3</sub>の活性化因子、p75ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、p75ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、p75細胞外ドメインポリペプチド、p75細胞外ドメインポリペプチドをコードする核酸分子、RhogDIポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、RhogDIポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、RhogDIポリペプチド、RhogDIポリペプチドをコードする核酸分子、MAGポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、MAGポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、p21ポリペプチド、p21をコードする核酸分子、Rhopolipeptideに対して特異的に相互作用する因子、Rhopolipeptideをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、Rhokinaseに対して特異的に相互作用する因子およびRhokinaseをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子ならびにその改変体およびフラグメントからなる群より選択される少なくとも1つの分子を含む、請求項21に記載の組成物。

【請求項30】

前記因子は、PTDドメインに結合する、請求項21に記載の組成物。

【請求項31】

神経疾患、神経障害および／または神経の状態を、処置、予防、診断または予後するための組成物であって、p75シグナル伝達経路を調節する因子を含む、組成物。

【請求項32】

前記p75シグナル伝達経路を調節する因子は、p75シグナル伝達経路における伝達因子もしくはその改変体もしくはフラグメント、またはp75シグナル伝達経路における伝達因子に対して特異的に相互作用する因子を含む、請求項31に記載の組成物。

【請求項33】

前記p75シグナル伝達経路における伝達因子は、MAG、PKC、IP<sub>3</sub>、GT1b、p75、RhogDI、Rhopolipeptide、p21およびRhokinaseからなる群より選択される少なくとも1つの伝達因子を含む、請求項31に記載の組成物。

【請求項34】

前記p75シグナル伝達経路の調節は、MAGとGT1bとの相互作用の阻害、PKCの阻害、IP<sub>3</sub>の活性化、GT1bとp75との相互作用の阻害、p75とRhopolipeptideとの相互作用の阻害、p75とRhogDIとの相互作用の阻害、RhopolipeptideとRhogDIとの相互作用の維持または強化、RhogDPからRhogGTPへの変換阻害、RhopolipeptideとRhokinaseとの相互作用の阻害およびRhokinaseの活性阻害からなる群より選択される、請求項31に記載の組成物。

【請求項35】

前記p75シグナル伝達経路を調節する因子は、MAGとGT1bとの相互作用を抑制または消失する因子、PKCの阻害因子、IP<sub>3</sub>の活性化因子、GT1bとp75との相互作用を抑制または消失する因子、p75とRhogDIとの相互作用を抑制または消失する因子、p75とRhopolipeptideとの相互作用を抑制または消失する因子、RhopolipeptideとRhogDIとの相互作用を維持または強化する因子、RhogDPからRhogGTPへの変換を阻害する因子、RhopolipeptideとRhokinaseとの相互作用を阻害する因子、およびRhokinaseの活性を阻害する因子からなる群より選択される少なくとも1つの因子を含む、請求項31に記載の組成物。

【請求項36】

経口または非経口での投与に適した形態である、請求項31に記載の組成物。

【請求項37】

前記神経は、脊髄損傷、脳血管障害または脳外傷を含む状態にある、請求項31に記載の組成物。

【請求項38】

前記p75シグナル伝達経路を調節する因子は、Pepp5ポリペプチド、Pepp5ポリペプチドをコードする核酸分子、PKCの阻害因子、IP<sub>3</sub>の活性化因子、p75ポリペ

チドに対して特異的に相互作用する因子、p 7 5 ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、p 7 5 細胞外ドメインポリペプチド、p 7 5 細胞外ドメインポリペプチドをコードする核酸分子、R h o G D I ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、R h o G D I ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、R h o G D I ポリペプチド、R h o G D I ポリペプチドをコードする核酸分子、M A G ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、M A G ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、p 2 1 ポリペプチド、p 2 1 をコードする核酸分子、R h o ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、R h o ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、R h o キナーゼに対して特異的に相互作用する因子および R h o キナーゼをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子ならびにその改変体およびフラグメントからなる群より選択される少なくとも 1 つの分子を含む、請求項 3 1 に記載の組成物。

【請求項 3 9】

さらに、1 以上のさらなる薬剤を含む、請求項 3 1 に記載の組成物。

【請求項 4 0】

前記因子は、P T D ドメインに結合する、請求項 3 1 に記載の組成物。

【請求項 4 1】

神経を再生するための組成物であって、P e p 5 ポリペプチドを含む、組成物。

【請求項 4 2】

前記 P e p 5 ポリペプチドは、

(a) 配列番号 1 に記載の核酸配列もしくはそのフラグメントによってコードされる、ポリペプチド；

(b) 配列番号 2 に記載のアミノ酸配列もしくはそのフラグメントを有する、ポリペプチド；

(c) 配列番号 2 に記載のアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が、置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも 1 つの変異を有する改変体ポリペプチドであって、生物学的活性を有する、改変体ポリペプチド；または

(d) (a) ~ (c) のいずれか 1 つのポリペプチドのアミノ酸配列に対する同一性が少なくとも 7 0 % であるアミノ酸配列からなり、かつ、生物学的活性を有する、ポリペプチド、

を含む、請求項 4 1 に記載の組成物。

【請求項 4 3】

前記 P e p 5 ポリペプチドは、配列番号 2 のアミノ酸配列の全範囲を含む、請求項 4 1 に記載の組成物。

【請求項 4 4】

前記神経は、脊髄損傷、脳血管障害または脳外傷を含む状態にある、請求項 4 1 に記載の組成物。

【請求項 4 5】

前記 P e p 5 ポリペプチドは、さらに、P T D ドメインを含む、請求項 4 1 に記載の組成物。

【請求項 4 6】

神経を再生するための組成物であって、P e p 5 ポリペプチドをコードする核酸分子を含む、組成物。

【請求項 4 7】

前記 P e p 5 ポリペプチドをコードする核酸分子は、

(a) 配列番号 1 に記載の塩基配列またはそのフラグメント配列を有する、ポリヌクレオチド；

(b) 配列番号 2 に記載のアミノ酸配列またはそのフラグメントをコードする、ポリヌクレオチド、

(c) 配列番号 2 に記載のアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が、置換、付

加および欠失からなる群より選択される少なくとも1つの変異を有する改変体ポリペプチドであって、生物学的活性を有する改変体ポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチド；

(d) (a) ~ (c) のいずれか1つのポリヌクレオチドにストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；または

(e) (a) ~ (c) のいずれか1つのポリヌクレオチドまたはその相補配列に対する同一性が少なくとも70%である塩基配列からなり、かつ、生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、を含む、請求項46に記載の組成物。

【請求項48】

前記Pep5ポリペプチドをコードする核酸分子は、配列番号1の核酸配列におけるヌクレオチド配列の全範囲を含む、請求項46に記載の組成物。

【請求項49】

前記神経は、脊髄損傷、脳血管障害または脳外傷を含む状態にある、請求項46に記載の組成物。

【請求項50】

前記Pep5ポリペプチドをコードする核酸分子は、PTDドメインをコードする配列を含む、請求項41に記載の組成物。

【請求項51】

神経を再生するための組成物であって、p75ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子を含む、組成物。

【請求項52】

前記p75ポリペプチドは、

(a) 配列番号3または16に記載の核酸配列のヌクレオチドもしくはそのフラグメントによってコードされる、ポリペプチド；

(b) 配列番号4または17に記載のアミノ酸配列のアミノ酸もしくはそのフラグメントを有する、ポリペプチド；

(c) 配列番号4または17に記載のアミノ酸配列のアミノ酸において、1以上のアミノ酸が、置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも1つの変異を有する改変体ポリペプチドであって、生物学的活性を有する、改変体ポリペプチド

(d) 配列番号3または16に記載の塩基配列のヌクレオチドのスプライス改変体もしくは対立遺伝子改変体によってコードされる、ポリペプチド；

(e) 配列番号4または17に記載のアミノ酸配列のアミノ酸を有するポリペプチドの、種相同体ポリペプチド；または

(f) (a) ~ (e) のいずれか1つのポリペプチドのアミノ酸配列に対する同一性が少なくとも70%であるアミノ酸配列からなり、かつ、生物学的活性を有する、ポリペプチド、

を含む、請求項51に記載の組成物。

【請求項53】

前記p75ポリペプチドは、配列番号4または17のアミノ酸配列のうち、それぞれ273位~427位または274位~425位の範囲を含む、請求項51に記載の組成物。

【請求項54】

前記神経は、脊髄損傷、脳血管障害または脳外傷を含む状態にある、請求項51に記載の組成物。

【請求項55】

前記因子は、抗体を含む、請求項51に記載の組成物。

【請求項56】

神経を再生するための組成物であって、p75ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子を含む、組成物。

**【請求項 57】**

前記 p 75 ポリペプチドをコードする核酸分子は、

(a) 配列番号 3 または 16 に記載の塩基配列のヌクレオチドまたはそのフラグメント配列を有する、ポリヌクレオチド；

(b) 配列番号 4 または 17 に記載のアミノ酸配列のアミノ酸またはそのフラグメントをコードする、ポリヌクレオチド、

(c) 配列番号 4 または 17 に記載のアミノ酸配列のアミノ酸において、1 以上のアミノ酸が、置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも 1 つの変異を有する改変体ポリペプチドであって、生物学的活性を有する改変体ポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチド；

(d) 配列番号 3 または 16 に記載の塩基配列のヌクレオチドのスプライス変異体または対立遺伝子変異体である、ポリヌクレオチド；

(e) 配列番号 4 または 17 に記載のアミノ酸配列のアミノ酸からなるポリペプチドの種相同体をコードする、ポリヌクレオチド；

(f) (a) ~ (e) のいずれか 1 つのポリヌクレオチドにストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；または

(g) (a) ~ (e) のいずれか 1 つのポリヌクレオチドまたはその相補配列に対する同一性が少なくとも 70 % である塩基配列からなり、かつ、生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、  
からなる群より選択される、ポリヌクレオチド、  
を含む、請求項 56 に記載の組成物。

**【請求項 58】**

前記 p 75 ポリペプチドをコードする核酸分子は、配列番号 3 または 16 の核酸配列において、それぞれヌクレオチド 1110 位~1283 位または 1113 位~1277 位の範囲を含む、請求項 56 に記載の組成物。

**【請求項 59】**

前記神経は、脊髄損傷、脳血管障害または脳外傷を含む状態にある、請求項 56 に記載の組成物。

**【請求項 60】**

前記因子は、p 75 ポリペプチドをコードする核酸分子のアンチセンスまたは RNA i である、請求項 56 に記載の組成物。

**【請求項 61】**

神経を再生するための組成物であって、p 75 細胞外ドメインポリペプチドを含む、組成物。

**【請求項 62】**

前記 p 75 細胞外ドメインは、

(a) 配列番号 3 または 16 に記載の核酸配列の、それぞれヌクレオチド 198 位~863 位または 201 位~866 位もしくはそのフラグメントによってコードされる、ポリペプチド；

(b) 配列番号 4 または 17 に記載のアミノ酸配列の、それぞれアミノ酸 29 位~250 位または 30 位~251 位もしくはそのフラグメントを有する、ポリペプチド；

(c) 配列番号 4 または 17 に記載のアミノ酸配列、それぞれアミノ酸 29 位~250 位または 30 位~251 位において、1 以上のアミノ酸が、置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも 1 つの変異を有する改変体ポリペプチドであって、生物学的活性を有する、改変体ポリペプチド

(d) 配列番号 3 または 16 に記載の塩基配列の、それぞれヌクレオチド 198 位~863 位または 201 位~866 位のスプライス改変体もしくは対立遺伝子改変体の配列によってコードされる、ポリペプチド；

(e) 配列番号 4 または 17 に記載のアミノ酸配列の、それぞれアミノ酸 29 位~

250位または30位～251位を有するポリペプチドの、種相同体ポリペプチド；または

(f) (a)～(e)のいずれか1つのポリペプチドのアミノ酸配列に対する同一性が少なくとも70%であるアミノ酸配列からなり、かつ、生物学的活性を有する、ポリペプチド、

を含む、請求項61に記載の組成物。

【請求項63】

前記p75細胞外ドメインポリペプチドは、配列番号4または17のアミノ酸配列において、それぞれアミノ酸29位～250位または30位～251位の範囲を含む、請求項61に記載の組成物。

【請求項64】

前記神経は、脊髄損傷、脳血管障害または脳外傷を含む状態にある、請求項61に記載の組成物。

【請求項65】

前記p75細胞外ドメインポリペプチドは、可溶性である、請求項61に記載の組成物。

【請求項66】

神経を再生するための組成物であって、p75細胞外ドメインポリペプチドをコードする核酸分子を含む、組成物。

【請求項67】

前記p75細胞外ドメインポリペプチドをコードする核酸分子は、

(a) 配列番号3または16に記載の塩基配列の、それぞれヌクレオチド198位～863位または201位～866位またはそのフラグメント配列を有する、ポリヌクレオチド；

(b) 配列番号4または17に記載のアミノ酸配列の、それぞれアミノ酸29位～250位または30位～251位またはそのフラグメントをコードする、ポリヌクレオチド、

(c) 配列番号4または17に記載のアミノ酸配列の、それぞれアミノ酸29位～250位または30位～251位において、1以上のアミノ酸が、置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも1つの変異を有する改変体ポリペプチドであって、生物学的活性を有する改変体ポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチド；

(d) 配列番号3または16に記載の塩基配列の、それぞれヌクレオチド198位～863位または201位～866位のスプライス変異体または対立遺伝子変異体である、ポリヌクレオチド；

(e) 配列番号4または17に記載のアミノ酸配列、それぞれアミノ酸29位～250位または30位～251位からなるポリペプチドの種相同体をコードする、ポリヌクレオチド；

(f) (a)～(e)のいずれか1つのポリヌクレオチドにストリンジントな条件下でハイブリダイズし、かつ生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；または

(g) (a)～(e)のいずれか1つのポリヌクレオチドまたはその相補配列に対する同一性が少なくとも70%である塩基配列からなり、かつ、生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、

からなる群より選択される、ポリヌクレオチド、

を含む、請求項66に記載の組成物。

【請求項68】

前記p75細胞外ドメインポリペプチドをコードする核酸分子は、配列番号3または16の核酸配列において、それぞれヌクレオチド198位～863位または201位～866位の範囲を含む、請求項66に記載の組成物。

【請求項69】

前記神経は、脊髄損傷、脳血管障害または脳外傷を含む状態にある、請求項66に記載の

組成物。

【請求項 70】

前記 p 75 細胞外ドメインポリペプチドは、可溶性である、請求項 66 に記載の組成物。

【請求項 71】

神経を再生するための組成物であって、R h o G D I ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子を含む、組成物。

【請求項 72】

前記 R h o G D I ポリペプチドは、

(a) 配列番号 5 に記載の核酸配列のヌクレオチドもしくはそのフラグメントによってコードされる、ポリペプチド；

(b) 配列番号 6 に記載のアミノ酸配列のアミノ酸もしくはそのフラグメントを有する、ポリペプチド；

(c) 配列番号 6 に記載のアミノ酸配列のアミノ酸において、1 以上のアミノ酸が、置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも 1 つの変異を有する改変体ポリペプチドであって、生物学的活性を有する、改変体ポリペプチド

(d) 配列番号 5 に記載の塩基配列のヌクレオチドのスプライス改変体もしくは対立遺伝子改変体によってコードされる、ポリペプチド；

(e) 配列番号 6 に記載のアミノ酸配列のアミノ酸を有するポリペプチドの、種相同志ポリペプチド；または

(f) (a) ~ (e) のいずれか 1 つのポリペプチドのアミノ酸配列に対する同一性が少なくとも 70 % であるアミノ酸配列からなり、かつ、生物学的活性を有する、ポリペプチド、

を含む、請求項 71 に記載の組成物。

【請求項 73】

前記 R h o G D I ポリペプチドは、配列番号 6 のアミノ酸配列の全範囲を含む、請求項 71 に記載の組成物。

【請求項 74】

前記神経は、脊髄損傷、脳血管障害または脳外傷を含む状態にある、請求項 71 に記載の組成物。

【請求項 75】

前記因子は、抗体を含む、請求項 71 に記載の組成物。

【請求項 76】

神経を再生するための組成物であって、R h o G D I ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子を含む、組成物。

【請求項 77】

前記 R h o G D I ポリペプチドをコードする核酸分子は、

(a) 配列番号 5 に記載の塩基配列のヌクレオチドまたはそのフラグメント配列を有する、ポリヌクレオチド；

(b) 配列番号 6 に記載のアミノ酸配列のアミノ酸またはそのフラグメントをコードする、ポリヌクレオチド、

(c) 配列番号 6 に記載のアミノ酸配列のアミノ酸において、1 以上のアミノ酸が、置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも 1 つの変異を有する改変体ポリペプチドであって、生物学的活性を有する改変体ポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチド；

(d) 配列番号 5 に記載の塩基配列のヌクレオチドのスプライス変異体または対立遺伝子変異体である、ポリヌクレオチド；

(e) 配列番号 6 に記載のアミノ酸配列のアミノ酸からなるポリペプチドの種相同志をコードする、ポリヌクレオチド；

(f) (a) ~ (e) のいずれか 1 つのポリヌクレオチドにストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌク

レオチド;または

(g) (a) ~ (e) のいずれか1つのポリヌクレオチドまたはその相補配列に対する同一性が少なくとも70%である塩基配列からなり、かつ、生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、  
からなる群より選択される、ポリヌクレオチド、  
を含む、請求項76に記載の組成物。

【請求項78】

前記RhogDは、配列番号5の核酸配列の全範囲を含む、請求項76に記載の組成物。

【請求項79】

前記神経は、脊髄損傷、脳血管障害または脳外傷を含む状態にある、請求項76に記載の組成物。

【請求項80】

前記因子は、アンチセンス分子またはRNAiを含む、請求項76に記載の組成物。

【請求項81】

神経を再生するための組成物であって、MAGポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子を含む、組成物。

【請求項82】

前記MAGポリペプチドは、

(a) 配列番号7に記載の核酸配列もしくはそのフラグメントによってコードされる、ポリペプチド;

(b) 配列番号8に記載のアミノ酸配列もしくはそのフラグメントを有する、ポリペプチド;

(c) 配列番号8に記載のアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が、置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも1つの変異を有する改変体ポリペプチドであって、生物学的活性を有する、改変体ポリペプチド

(d) 配列番号7に記載の塩基配列のスプライス改変体もしくは対立遺伝子改変体によってコードされる、ポリペプチド;

(e) 配列番号8に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドの、種相同体ポリペプチド;または

(f) (a) ~ (e) のいずれか1つのポリペプチドのアミノ酸配列に対する同一性が少なくとも70%であるアミノ酸配列からなり、かつ、生物学的活性を有する、ポリペプチド、

を含む、請求項81に記載の組成物。

【請求項83】

前記MAGポリペプチドは、配列番号8のアミノ酸配列の1位~626位を含む、請求項81に記載の組成物。

【請求項84】

前記神経は、脊髄損傷、脳血管障害または脳外傷を含む状態にある、請求項81に記載の組成物。

【請求項85】

前記因子は、抗体を含む、請求項81に記載の組成物。

【請求項86】

神経を再生するための組成物であって、MAGポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子を含む、組成物。

【請求項87】

前記MAGポリペプチドをコードする核酸分子は、

(a) 配列番号7に記載の塩基配列のヌクレオチドまたはそのフラグメント配列を有する、ポリヌクレオチド;

(b) 配列番号8に記載のアミノ酸配列のアミノ酸またはそのフラグメントをコー



ドする、ポリヌクレオチド、

(c) 配列番号 8 に記載のアミノ酸配列のアミノ酸において、1 以上のアミノ酸が、置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも 1 つの変異を有する改変体ポリペプチドであって、生物学的活性を有する改変体ポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチド；

(d) 配列番号 7 に記載の塩基配列のヌクレオチドのスプライス変異体または対立遺伝子変異体である、ポリヌクレオチド；

(e) 配列番号 8 に記載のアミノ酸配列のアミノ酸からなるポリペプチドの種相同体をコードする、ポリヌクレオチド；

(f) (a) ~ (e) のいずれか 1 つのポリヌクレオチドにストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；または

(g) (a) ~ (e) のいずれか 1 つのポリヌクレオチドまたはその相補配列に対する同一性が少なくとも 70 % である塩基配列からなり、かつ、生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、  
からなる群より選択される、ポリヌクレオチド、  
を含む、請求項 86 に記載の組成物。

【請求項 88】

前記 M A G ポリペプチドをコードする核酸分子は、配列番号 7 の核酸配列において、1 位 ~ 2475 位の範囲を含む、請求項 86 に記載の組成物。

【請求項 89】

前記神経は、脊髄損傷、脳血管障害または脳外傷を含む状態にある、請求項 86 に記載の組成物。

【請求項 90】

前記因子は、M A G ポリペプチドをコードする核酸分子のアンチセンスまたは R N A i である、請求項 86 に記載の組成物。

【請求項 91】

神経を再生するための組成物であって、R h o ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子を含む、組成物。

【請求項 92】

前記 R h o ポリペプチドは、

(a) 配列番号 11 に記載の核酸配列のヌクレオチドもしくはそのフラグメントによってコードされる、ポリペプチド；

(b) 配列番号 12 に記載のアミノ酸配列のアミノ酸もしくはそのフラグメントを有する、ポリペプチド；

(c) 配列番号 12 に記載のアミノ酸配列のアミノ酸において、1 以上のアミノ酸が、置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも 1 つの変異を有する改変体ポリペプチドであって、生物学的活性を有する、改変体ポリペプチド

(d) 配列番号 11 に記載の塩基配列のヌクレオチドのスプライス改変体もしくは対立遺伝子改変体によってコードされる、ポリペプチド；

(e) 配列番号 12 に記載のアミノ酸配列のアミノ酸を有するポリペプチドの、種相同体ポリペプチド；または

(f) (a) ~ (e) のいずれか 1 つのポリペプチドのアミノ酸配列に対する同一性が少なくとも 70 % であるアミノ酸配列からなり、かつ、生物学的活性を有する、ポリペプチド、

を含む、請求項 91 に記載の組成物。

【請求項 93】

前記 R h o ポリペプチドは、配列番号 12 のアミノ酸の 1 位 ~ 193 位を含む、請求項 91 に記載の組成物。

【請求項 94】

前記神経は、脊髄損傷、脳血管障害または脳外傷を含む状態にある、請求項 9 1 に記載の組成物。

【請求項 9 5】

前記因子は、抗体を含む、請求項 9 1 に記載の組成物。

【請求項 9 6】

神経を再生するための組成物であって、R h o ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子を含む、組成物。

【請求項 9 7】

前記 R h o ポリペプチドをコードする核酸分子は、

(a) 配列番号 1 1 に記載の塩基配列のヌクレオチドまたはそのフラグメント配列を有する、ポリヌクレオチド；

(b) 配列番号 1 2 に記載のアミノ酸配列のアミノ酸またはそのフラグメントをコードする、ポリヌクレオチド、

(c) 配列番号 1 2 に記載のアミノ酸配列のアミノ酸において、1 以上のアミノ酸が、置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも 1 つの変異を有する改変体ポリペプチドであって、生物学的活性を有する改変体ポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチド；

(d) 配列番号 1 1 に記載の塩基配列のヌクレオチドのスプライス変異体または対立遺伝子変異体である、ポリヌクレオチド；

(e) 配列番号 1 2 に記載のアミノ酸配列のアミノ酸からなるポリペプチドの種相同志をコードする、ポリヌクレオチド；

(f) (a) ~ (e) のいずれか 1 つのポリヌクレオチドにストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；または

(g) (a) ~ (e) のいずれか 1 つのポリヌクレオチドまたはその相補配列に対する同一性が少なくとも 70 % である塩基配列からなり、かつ、生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、からなる群より選択される、ポリヌクレオチド、を含む、請求項 9 6 に記載の組成物。

【請求項 9 8】

前記 R h o ポリペプチドをコードする核酸分子は、配列番号 1 1 の 1 位 ~ 5 7 9 位を含む、請求項 9 6 に記載の組成物。

【請求項 9 9】

前記神経は、脊髄損傷、脳血管障害または脳外傷を含む状態にある、請求項 9 6 に記載の組成物。

【請求項 1 0 0】

前記因子は、アンチセンス分子または R N A i を含む、請求項 9 6 に記載の組成物。

【請求項 1 0 1】

神経を再生するための組成物であって、R h o キナーゼポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子を含む、組成物。

【請求項 1 0 2】

前記 R h o キナーゼポリペプチドは、

(a) 配列番号 1 8 に記載の核酸配列のヌクレオチドもしくはそのフラグメントによってコードされる、ポリペプチド；

(b) 配列番号 1 9 に記載のアミノ酸配列のアミノ酸もしくはそのフラグメントを有する、ポリペプチド；

(c) 配列番号 1 9 に記載のアミノ酸配列のアミノ酸において、1 以上のアミノ酸が、置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも 1 つの変異を有する改変体ポリペプチドであって、生物学的活性を有する、改変体ポリペプチド

(d) 配列番号 1 8 に記載の塩基配列のヌクレオチドのスプライス改変体もしくは

対立遺伝子改変体によってコードされる、ポリペプチド；

(e) 配列番号 19 に記載のアミノ酸配列のアミノ酸を有するポリペプチドの、種相共同体ポリペプチド；または

(f) (a) ~ (e) のいずれか 1 つのポリペプチドのアミノ酸配列に対する同一性が少なくとも 70 % であるアミノ酸配列からなり、かつ、生物学的活性を有する、ポリペプチド、

を含む、請求項 101 に記載の組成物。

【請求項 103】

前記 R h o キナーゼポリペプチドは、配列番号 19 のアミノ酸の 1 位 ~ 1388 位を含む、請求項 101 に記載の組成物。

【請求項 104】

前記神経は、脊髄損傷、脳血管障害または脳外傷を含む状態にある、請求項 101 に記載の組成物。

【請求項 105】

前記因子は、抗体を含む、請求項 101 に記載の組成物。

【請求項 106】

神経を再生するための組成物であって、R h o キナーゼポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子を含む、組成物。

【請求項 107】

前記 R h o キナーゼポリペプチドをコードする核酸分子は、

(a) 配列番号 18 に記載の塩基配列のヌクレオチドまたはそのフラグメント配列を有する、ポリヌクレオチド；

(b) 配列番号 19 に記載のアミノ酸配列のアミノ酸またはそのフラグメントをコードする、ポリヌクレオチド、

(c) 配列番号 19 に記載のアミノ酸配列のアミノ酸において、1 以上のアミノ酸が、置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも 1 つの変異を有する改変体ポリペプチドであって、生物学的活性を有する改変体ポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチド；

(d) 配列番号 18 に記載の塩基配列のヌクレオチドのスプライス変異体または対立遺伝子変異体である、ポリヌクレオチド；

(e) 配列番号 19 に記載のアミノ酸配列のアミノ酸からなるポリペプチドの種相共同体をコードする、ポリヌクレオチド；

(f) (a) ~ (e) のいずれか 1 つのポリヌクレオチドにストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；または

(g) (a) ~ (e) のいずれか 1 つのポリヌクレオチドまたはその相補配列に対する同一性が少なくとも 70 % である塩基配列からなり、かつ、生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、  
からなる群より選択される、ポリヌクレオチド、  
を含む、請求項 106 に記載の組成物。

【請求項 108】

前記 R h o キナーゼは、配列番号 18 の 1 位 ~ 4164 位を含む、請求項 106 に記載の組成物。

【請求項 109】

前記神経は、脊髄損傷、脳血管障害または脳外傷を含む状態にある、請求項 106 に記載の組成物。

【請求項 110】

前記因子は、アンチセンス分子または RNA i を含む、請求項 106 に記載の組成物。

【請求項 111】

神経を再生するための組成物であって、p21 ポリペプチドを含む、組成物。

**【請求項 112】**

前記 p 21 ポリペプチドは、

(a) 配列番号 13 または配列番号 22 に記載の核酸配列のヌクレオチドもしくはそのフラグメントによってコードされる、ポリペプチド；

(b) 配列番号 14 または配列番号 23 に記載のアミノ酸配列のアミノ酸もしくはそのフラグメントを有する、ポリペプチド；

(c) 配列番号 14 または配列番号 23 に記載のアミノ酸配列のアミノ酸において、1 以上のアミノ酸が、置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも 1 つの変異を有する改変体ポリペプチドであって、生物学的活性を有する、改変体ポリペプチド

(d) 配列番号 13 または配列番号 22 に記載の塩基配列のヌクレオチドのサプライズ改変体もしくは対立遺伝子改変体によってコードされる、ポリペプチド；

(e) 配列番号 14 または配列番号 23 に記載のアミノ酸配列のアミノ酸を有するポリペプチドの、種相同体ポリペプチド；または

(f) (a) ~ (e) のいずれか 1 つのポリペプチドのアミノ酸配列に対する同一性が少なくとも 70 % であるアミノ酸配列からなり、かつ、生物学的活性を有する、ポリペプチド、

を含む、請求項 111 に記載の組成物。

**【請求項 113】**

前記 p 21 ポリペプチドは、配列番号 14 または配列番号 23 のアミノ酸の 1 位 ~ 140 位を含む、請求項 111 に記載の組成物。

**【請求項 114】**

前記神経は、脊髄損傷、脳血管障害または脳外傷を含む状態にある、請求項 111 に記載の組成物。

**【請求項 115】**

前記 p 21 ポリペプチドは、さらに、PTD ドメインを含む、請求項 111 に記載の組成物。

**【請求項 116】**

前記 PTD ドメインは、YGRKKRRQRRR またはその 1 または数個の置換、付加および／もしくは欠失を含むアミノ酸配列を有する、請求項 115 に記載の組成物。

**【請求項 117】**

前記 PTD ドメインは、前記 p 21 ポリペプチドの C 末端側または N 末端側に配置される、請求項 115 に記載の組成物。

**【請求項 118】**

前記 p 21 ポリペプチドは、核移行ドメインを実質的に含まない、請求項 111 に記載の組成物。

**【請求項 119】**

前記 p 21 ポリペプチドは、さらに、PTD ドメインを含み、かつ、該 p 21 ポリペプチドは、核移行ドメインを実質的に含まない、請求項 111 に記載の組成物。

**【請求項 120】**

前記 p 21 ポリペプチドは、さらに、PTD ドメインを含み、かつ、該 p 21 ポリペプチドは、核移行ドメインを実質的に含まず、該 PTD ドメインは該 p 21 ポリペプチドの C 末端側に配置される、請求項 111 に記載の組成物。

**【請求項 121】**

神経を再生するための組成物であって、p 21 ポリペプチドをコードする核酸分子を含む、組成物。

**【請求項 122】**

前記 p 21 ポリペプチドをコードする核酸分子は、

(a) 配列番号 13 または配列番号 22 に記載の塩基配列のヌクレオチドまたはそのフラグメント配列を有する、ポリヌクレオチド；

(b) 配列番号 14 または配列番号 23 に記載のアミノ酸配列のアミノ酸またはそのフラグメントをコードする、ポリヌクレオチド;

(c) 配列番号 14 または配列番号 23 に記載のアミノ酸配列のアミノ酸において、1 以上のアミノ酸が、置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも 1 つの変異を有する改変体ポリペプチドであって、生物学的活性を有する改変体ポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチド;

(d) 配列番号 13 または配列番号 22 に記載の塩基配列のヌクレオチドのスプライス変異体または対立遺伝子変異体である、ポリヌクレオチド;

(e) 配列番号 14 または配列番号 23 に記載のアミノ酸配列のアミノ酸からなるポリペプチドの種相同体をコードする、ポリヌクレオチド;

(f) (a) ~ (e) のいずれか 1 つのポリヌクレオチドにストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド; または

(g) (a) ~ (e) のいずれか 1 つのポリヌクレオチドまたはその相補配列に対する同一性が少なくとも 70 % である塩基配列からなり、かつ、生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、からなる群より選択される、ポリヌクレオチド、を含む、請求項 121 に記載の組成物。

【請求項 123】

前記 p 21 ポリペプチドをコードする核酸分子は、配列番号 13 または配列番号 22 の塩基配列の 1 位 ~ 420 位を含む、請求項 121 に記載の組成物。

【請求項 124】

前記神経は、脊髄損傷、脳血管障害または脳外傷を含む状態にある、請求項 121 に記載の組成物。

【請求項 125】

前記 p 21 ポリペプチドをコードする核酸分子は、さらに、PTD ドメインをコードする因子を含む、請求項 121 に記載の組成物。

【請求項 126】

前記 PTD ドメインは、YGRKKRRQRRR またはその 1 または数個の置換、付加および/もしくは欠失を含むアミノ酸配列を有する、請求項 125 に記載の組成物。

【請求項 127】

前記 PTD ドメインをコードする配列は、前記 p 21 ポリペプチドをコードする配列の 5' 末端側または 3' 末端側に配置される、請求項 125 に記載の組成物。

【請求項 128】

前記 p 21 ポリペプチドをコードする核酸分子は、核移行ドメインをコードする配列を実質的に含まない、請求項 121 に記載の組成物。

【請求項 129】

前記 p 21 ポリペプチドをコードする核酸分子は、さらに、PTD ドメインをコードする配列を含み、かつ、該 p 21 ポリペプチドをコードする核酸分子は、核移行ドメインをコードする配列を実質的に含まない、請求項 121 に記載の組成物。

【請求項 130】

前記 p 21 ポリペプチドをコードする核酸分子は、さらに、PTD ドメインをコードする配列を含み、かつ、該 p 21 ポリペプチドをコードする核酸分子は、核移行ドメインをコードする配列を実質的に含まず、該 PTD ドメインをコードする配列は該 p 21 ポリペプチドをコードする核酸分子の 3' 末端側に配置される、請求項 121 に記載の組成物。

【請求項 131】

PTD ドメインおよび神経再生因子を含む、神経を再生するための組成物。

【請求項 132】

前記神経再生因子は、p 75 シグナル伝達経路を阻害する、請求項 131 に記載の組成物。

**【請求項 133】**

前記神経再生因子は、p75シグナル伝達経路における伝達因子もしくはその改変体もしくはフラグメント、またはp75シグナル伝達経路における伝達因子に対して特異的に相互作用する因子を含む、請求項131に記載の組成物。

**【請求項 134】**

前記p75シグナル伝達経路における伝達因子は、MAG、PKC、IP<sub>3</sub>、GTPb、p75、Rho GDI、Rho、p21およびRhoキナーゼからなる群より選択される少なくとも1つの伝達因子を含む、請求項133に記載の組成物。

**【請求項 135】**

前記神経再生因子は、MAGとGTPbとの相互作用の阻害、PKCの阻害、IP<sub>3</sub>の活性化、GTPbとp75との相互作用の阻害、p75とRhoとの相互作用の阻害、p75とRho GDIとの相互作用の阻害、RhoとRho GDIとの相互作用の維持または強化、RhoGDPからRhoGTPへの変換阻害、RhoとRhoキナーゼとの相互作用の阻害およびRhoキナーゼの活性阻害からなる群より選択される少なくとも1つの作用を有する、請求項131に記載の組成物。

**【請求項 136】**

前記神経再生因子は、MAGとGTPbとの相互作用を抑制または消失する因子、PKCの阻害因子、IP<sub>3</sub>の活性化因子、GTPbとp75との相互作用を抑制または消失する因子、p75とRho GDIとの相互作用を抑制または消失する因子、p75とRhoとの相互作用を抑制または消失する因子、RhoとRho GDIとの相互作用を維持または強化する因子、RhoGDPからRhoGTPへの変換を阻害する因子、RhoとRhoキナーゼとの相互作用を阻害する因子、およびRhoキナーゼの活性を阻害する因子からなる群より選択される少なくとも1つの因子を含む、請求項131に記載の組成物。

**【請求項 137】**

前記神経再生因子は、Pep5ポリペプチド、Pep5ポリペプチドをコードする核酸分子、PKCの阻害因子、IP<sub>3</sub>の活性化因子、p75ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、p75ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、p75細胞外ドメインポリペプチド、p75細胞外ドメインポリペプチドをコードする核酸分子、Rho GDIポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、Rho GDIポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、Rho GDIポリペプチド、Rho GDIポリペプチドをコードする核酸分子、MAGポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、MAGポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、p21ポリペプチド、p21をコードする核酸分子、Rhoポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、Rhoポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、Rhoキナーゼに対して特異的に相互作用する因子およびRhoキナーゼをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子ならびにその改変体およびフラグメントからなる群より選択される因子を含む、請求項131に記載の組成物。

**【請求項 138】**

前記PTDドメインは、YGRKKRRQRRRまたはその1または数個の置換、付加および／もしくは欠失を含むアミノ酸配列を有する、請求項131に記載の組成物。

**【請求項 139】**

前記PTDドメインは、前記神経再生因子のC末端側またはN末端側に配置される、請求項131に記載の組成物。

**【請求項 140】**

前記神経再生因子は、細胞質に留まり得る、請求項131に記載の組成物。

**【請求項 141】**

PTDドメインをコードする核酸配列および神経再生因子をコードする核酸配列を含む核酸分子を含む、神経を再生するための組成物。

**【請求項 142】**

前記神経再生因子は、p75シグナル伝達経路を阻害する、請求項141に記載の組成物。

【請求項143】

前記神経再生因子は、p75シグナル伝達経路における伝達因子もしくはその改変体もしくはフラグメント、またはp75シグナル伝達経路における伝達因子に対して特異的に相互作用する因子を含む、請求項141に記載の組成物。

【請求項144】

前記p75シグナル伝達経路における伝達因子は、MAG、PKC、IP<sub>3</sub>、GT1b、p75、Rho GDI、Rho、p21およびRhoキナーゼからなる群より選択される少なくとも1つの伝達因子を含む、請求項143に記載の組成物。

【請求項145】

前記神経再生因子は、MAGとGT1bとの相互作用の阻害、PKCの阻害、IP<sub>3</sub>の活性化、GT1bとp75との相互作用の阻害、p75とRhoとの相互作用の阻害、p75とRho GDIとの相互作用の阻害、RhoとRho GDIとの相互作用の維持または強化、Rho GDPからRho GTPへの変換阻害、RhoとRhoキナーゼとの相互作用の阻害およびRhoキナーゼの活性阻害からなる群より選択される少なくとも1つの作用を有する、請求項141に記載の組成物。

【請求項146】

前記神経再生因子は、MAGとGT1bとの相互作用を抑制または消失する因子、PKCの阻害因子、IP<sub>3</sub>の活性化因子、GT1bとp75との相互作用を抑制または消失する因子、p75とRho GDIとの相互作用を抑制または消失する因子、p75とRhoとの相互作用を抑制または消失する因子、RhoとRho GDIとの相互作用を維持または強化する因子、Rho GDPからRho GTPへの変換を阻害する因子、RhoとRhoキナーゼとの相互作用を阻害する因子、およびRhoキナーゼの活性を阻害する因子からなる群より選択される少なくとも1つの因子を含む、請求項141に記載の組成物。

【請求項147】

前記神経再生因子は、Pep5ポリペプチド、PKCの阻害因子、IP<sub>3</sub>の活性化因子、p75ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、p75ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、p75細胞外ドメインポリペプチド、Rho GDIポリペプチド、MAGポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、MAGポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、p21ポリペプチド、Rhoポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、Rhoポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、Rhoキナーゼに対して特異的に相互作用する因子およびRhoキナーゼをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子ならびにその改変体およびフラグメントからなる群より選択される因子を含む、請求項141に記載の組成物。

【請求項148】

前記PTDドメインは、YGRKKRRQRRRまたはその1または数個の置換、付加および／もしくは欠失を含むアミノ酸配列を有する、請求項141に記載の組成物。

【請求項149】

前記PTDドメインをコードする配列は、前記神経再生因子の5'末端側または3'末端側に配置される、請求項141に記載の組成物。

【請求項150】

前記神経再生因子は、細胞質中に留まり得る、請求項141に記載の組成物。

【請求項151】

神経突起伸展の阻害を破壊または減少する方法であって、p75シグナル伝達経路を阻害する工程を含む、方法。

【請求項152】

前記p75シグナル伝達経路の阻害は、p75シグナル伝達経路における伝達因子もしくはその改変体もしくはフラグメント、またはp75シグナル伝達経路における伝達因子に

対して特異的に相互作用する因子を再生に有効な量で提供することによる、請求項151に記載の方法。

【請求項153】

前記 p 7 5 シグナル伝達経路における伝達因子は、MAG、PKC、IP<sub>3</sub>、GTPb、p 7 5、Rho GDI、Rho、p 2 1 および Rho キナーゼからなる群より選択される少なくとも1つの伝達因子を含む、請求項151に記載の方法。

【請求項154】

前記 p 7 5 シグナル伝達経路の阻害は、MAGとGTPbとの相互作用の阻害、PKCの阻害、IP<sub>3</sub>の活性化、GTPbとp 7 5との相互作用の阻害、p 7 5とRhoとの相互作用の阻害、p 7 5とRho GDIとの相互作用の阻害、RhoとRho GDIとの相互作用の維持または強化、Rho GDPからRho GTPへの変換阻害、RhoとRho キナーゼとの相互作用の阻害およびRho キナーゼの活性阻害からなる群より選択される、請求項151に記載の方法。

【請求項155】

前記 p 7 5 シグナル伝達経路の阻害は、MAGとGTPbとの相互作用を抑制または消失する因子、PKCの阻害因子、IP<sub>3</sub>の活性化因子、GTPbとp 7 5との相互作用を抑制または消失する因子、p 7 5とRho GDIとの相互作用を抑制または消失する因子、p 7 5とRhoとの相互作用を抑制または消失する因子、RhoとRho GDIとの相互作用を維持または強化する因子、Rho GDPからRho GTPへの変換を阻害する因子、RhoとRho キナーゼとの相互作用を阻害する因子、およびRho キナーゼの活性を阻害する因子からなる群より選択される少なくとも1つの因子を再生に有効な量で提供することによる、請求項151に記載の方法。

【請求項156】

前記 p 7 5 シグナル伝達経路を阻害する工程は、再生に有効な量の、Pep 5 ポリペプチド、Pep 5 ポリペプチドをコードする核酸分子、PKCの阻害因子、IP<sub>3</sub>の活性化因子、p 7 5 ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、p 7 5 ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、p 7 5 細胞外ドメインポリペプチド、p 7 5 細胞外ドメインポリペプチドをコードする核酸分子、Rho GDI ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、Rho GDI ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、Rho GDI ポリペプチド、Rho GDI ポリペプチドをコードする核酸分子、MAG ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、MAG ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、p 2 1 ポリペプチド、p 2 1 をコードする核酸分子、Rho ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、Rho ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、Rho キナーゼに対して特異的に相互作用する因子およびRho キナーゼをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子ならびにその改変体およびフラグメントからなる群より選択される少なくとも1つの分子を含む組成物を該神経に与える工程、を包含する、請求項151に記載の方法。

【請求項157】

前記因子は、PTDドメインに結合する、請求項153に記載の方法。

【請求項158】

p 7 5 シグナル伝達経路を阻害する因子を含む、神経突起伸展の阻害を破壊または減少する組成物。

【請求項159】

前記 p 7 5 シグナル伝達経路を阻害する因子は、神経再生が所望される部位における神経細胞に送達されるのに適切な形態である、請求項158に記載の組成物。

【請求項160】

前記 p 7 5 シグナル伝達経路を阻害する因子は、p 7 5 シグナル伝達経路における伝達因子もしくはその改変体もしくはフラグメント、または p 7 5 シグナル伝達経路における伝達因子に対して特異的に相互作用する因子を含む、請求項158に記載の組成物。



**【請求項 161】**

前記 p 75 シグナル伝達経路における伝達因子は、MAG、PKC、IP<sub>3</sub>、GT1b、p 75、Rho GDI、Rho、p 21 および Rho キナーゼからなる群より選択される少なくとも 1 つの伝達因子を含む、請求項 160 に記載の組成物。

**【請求項 162】**

前記 p 75 シグナル伝達経路を阻害する因子は、MAG と GT1b との相互作用の阻害、PKC の阻害、IP<sub>3</sub> の活性化、GT1b と p 75 との相互作用の阻害、p 75 と Rho との相互作用の阻害、p 75 と Rho GDI との相互作用の阻害、Rho と Rho GDI との相互作用の維持または強化、Rho GDP から Rho GTP への変換阻害、Rho と Rho キナーゼとの相互作用の阻害および Rho キナーゼの活性阻害からなる群より選択される少なくとも 1 つの作用を有する、請求項 158 に記載の組成物。

**【請求項 163】**

前記 p 75 シグナル伝達経路を阻害する因子は、MAG と GT1b との相互作用を抑制または消失する因子、PKC の阻害因子、IP<sub>3</sub> の活性化因子、GT1b と p 75 との相互作用を抑制または消失する因子、p 75 と Rho GDI との相互作用を抑制または消失する因子、p 75 と Rho との相互作用を抑制または消失する因子、Rho と Rho GDI との相互作用を維持または強化する因子、Rho GDP から Rho GTP への変換を阻害する因子、Rho と Rho キナーゼとの相互作用を阻害する因子、および Rho キナーゼの活性を阻害する因子からなる群より選択される少なくとも 1 つの因子を含み、該前記 p 75 シグナル伝達経路を阻害する因子は、再生に有効な量で存在する、請求項 158 に記載の組成物。

**【請求項 164】**

前記 p 75 シグナル伝達経路を阻害する因子は、Pep5 ポリペプチド、Pep5 ポリペプチドをコードする核酸分子、PKC の阻害因子、IP<sub>3</sub> の活性化因子、p 75 ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、p 75 ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、p 75 細胞外ドメインポリペプチド、p 75 細胞外ドメインポリペプチドをコードする核酸分子、Rho GDI ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、Rho GDI ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、Rho GDI ポリペプチド、Rho GDI ポリペプチドをコードする核酸分子、MAG ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、MAG ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、p 21 ポリペプチド、p 21 をコードする核酸分子、Rho ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、Rho ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、Rho キナーゼに対して特異的に相互作用する因子および Rho キナーゼをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子ならびにその改変体およびフラグメントからなる群より選択される少なくとも 1 つの分子を含む、請求項 158 に記載の組成物。

**【請求項 165】**

前記因子は、PTD ドメインに結合する、請求項 158 に記載の組成物。

**【請求項 166】**

神経細胞のネットワークの構築のための方法であって、該神経細胞における p 75 シグナル伝達経路を阻害する工程を含む、方法。

**【請求項 167】**

前記 p 75 シグナル伝達経路の阻害は、p 75 シグナル伝達経路における伝達因子もしくはその改変体もしくはフラグメント、または p 75 シグナル伝達経路における伝達因子に対して特異的に相互作用する因子を再生に有効な量で前記神経細胞に提供することによる、請求項 166 に記載の方法。

**【請求項 168】**

前記 p 75 シグナル伝達経路における伝達因子は、MAG、PKC、IP<sub>3</sub>、GT1b、p 75、Rho GDI、Rho、p 21 および Rho キナーゼからなる群より選択される少なくとも 1 つの伝達因子を含む、請求項 166 に記載の方法。

## 【請求項 169】

前記 p 75 シグナル伝達経路の阻害は、MAG と GT1b との相互作用の阻害、PKC の阻害、IP<sub>3</sub> の活性化、GT1b と p 75 との相互作用の阻害、p 75 と Rho との相互作用の阻害、p 75 と Rho GDI との相互作用の阻害、Rho と Rho GDI との相互作用の維持または強化、Rho GDP から Rho GTP への変換阻害、Rho と Rho キナーゼとの相互作用の阻害および Rho キナーゼの活性阻害からなる群より選択される、請求項 166 に記載の方法。

## 【請求項 170】

前記 p 75 シグナル伝達経路の阻害は、MAG と GT1b との相互作用を抑制または消失する因子、PKC の阻害因子、IP<sub>3</sub> の活性化因子、GT1b と p 75 との相互作用を抑制または消失する因子、p 75 と Rho GDI との相互作用を抑制または消失する因子、p 75 と Rho との相互作用を抑制または消失する因子、Rho と Rho GDI との相互作用を維持または強化する因子、Rho GDP から Rho GTP への変換を阻害する因子、Rho と Rho キナーゼとの相互作用を阻害する因子、および Rho キナーゼの活性を阻害する因子からなる群より選択される少なくとも 1 つの因子を再生に有効な量で提供することによる、請求項 166 に記載の方法。

## 【請求項 171】

前記 p 75 シグナル伝達経路を阻害する工程は、再生に有効な量の、Pep5 ポリペプチド、Pep5 ポリペプチドをコードする核酸分子、PKC の阻害因子、IP<sub>3</sub> の活性化因子、p 75 ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、p 75 ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、p 75 細胞外ドメインポリペプチド、p 75 細胞外ドメインポリペプチドをコードする核酸分子、Rho GDI ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、Rho GDI ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、Rho GDI ポリペプチド、Rho GDI ポリペプチドをコードする核酸分子、MAG ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、MAG ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、p 21 ポリペプチド、p 21 をコードする核酸分子、Rho ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、Rho ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、Rho キナーゼに対して特異的に相互作用する因子および Rho キナーゼをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子ならびにその改変体およびフラグメントからなる群より選択される少なくとも 1 つの分子を含む組成物を該神経に与える工程、を包含する、請求項 166 に記載の方法。

## 【請求項 172】

前記因子は、PTD ドメインに結合する、請求項 167 に記載の方法。

## 【請求項 173】

p 75 シグナル伝達経路を阻害する因子を含む、神経細胞のネットワークの構築のための組成物。

## 【請求項 174】

前記 p 75 シグナル伝達経路を阻害する因子は、p 75 シグナル伝達経路における伝達因子もしくはその改変体もしくはフラグメント、または p 75 シグナル伝達経路における伝達因子に対して特異的に相互作用する因子を含む、請求項 173 に記載の組成物。

## 【請求項 175】

前記 p 75 シグナル伝達経路における伝達因子は、MAG、PKC、IP<sub>3</sub>、GT1b、p 75、Rho GDI、Rho、p 21 および Rho キナーゼからなる群より選択される少なくとも 1 つの伝達因子を含む、請求項 174 に記載の組成物。

## 【請求項 176】

前記 p 75 シグナル伝達経路を阻害する因子は、MAG と GT1b との相互作用の阻害、PKC の阻害、IP<sub>3</sub> の活性化、GT1b と p 75 との相互作用の阻害、p 75 と Rho との相互作用の阻害、p 75 と Rho GDI との相互作用の阻害、Rho と Rho GDI との相互作用の維持または強化、Rho GDP から Rho GTP への変換阻害、Rho

o と R h o キナーゼとの相互作用の阻害および R h o キナーゼの活性阻害からなる群より選択される少なくとも 1 つの作用を有する、請求項 173 に記載の組成物。

【請求項 177】

前記 p 75 シグナル伝達経路を阻害する因子は、MAG と G T 1 b との相互作用を抑制または消失する因子、P K C の阻害因子、I P<sub>3</sub> の活性化因子、G T 1 b と p 75 との相互作用を抑制または消失する因子、p 75 と R h o G D I との相互作用を抑制または消失する因子、p 75 と R h o との相互作用を抑制または消失する因子、R h o と R h o G D I との相互作用を維持または強化する因子、R h o G D P から R h o G T P への変換を阻害する因子、R h o と R h o キナーゼとの相互作用を阻害する因子、および R h o キナーゼの活性を阻害する因子からなる群より選択される少なくとも 1 つの因子を含み、該前記 p 75 シグナル伝達経路を阻害する因子は、再生に有効な量で存在する、請求項 173 に記載の組成物。

【請求項 178】

前記 p 75 シグナル伝達経路を阻害する因子は、P e p 5 ポリペプチド、P e p 5 ポリペプチドをコードする核酸分子、P K C の阻害因子、I P<sub>3</sub> の活性化因子、p 75 ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、p 75 ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、p 75 細胞外ドメインポリペプチド、p 75 細胞外ドメインポリペプチドをコードする核酸分子、R h o G D I ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、R h o G D I ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、R h o G D I ポリペプチド、R h o G D I ポリペプチドをコードする核酸分子、MAG ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、MAG ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、p 21 ポリペプチド、p 21 をコードする核酸分子、R h o ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、R h o ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、R h o キナーゼに対して特異的に相互作用する因子および R h o キナーゼをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子ならびにその改変体およびフラグメントからなる群より選択される少なくとも 1 つの分子を含む、請求項 173 に記載の組成物。

【請求項 179】

前記因子は、P T D ドメインに結合する、請求項 174 に記載の組成物。

【請求項 180】

神経学的疾患を処置するためのキットであって、

(A) p 75 シグナル伝達経路を阻害する因子を含む組成物によって再生された細胞集団；

(B) 該細胞集団を保存するための容器を包含する、キット。

【請求項 181】

前記前記 p 75 シグナル伝達経路を阻害する因子は、p 75 シグナル伝達経路における伝達因子もしくはその改変体もしくはフラグメント、または p 75 シグナル伝達経路における伝達因子に対して特異的に相互作用する因子を含む、請求項 180 に記載のキット。

【請求項 182】

前記 p 75 シグナル伝達経路における伝達因子は、MAG、P K C、I P<sub>3</sub>、G T 1 b、p 75、R h o G D I、R h o、p 21 および R h o キナーゼからなる群より選択される少なくとも 1 つの伝達因子を含む、請求項 181 に記載のキット。

【請求項 183】

前記 p 75 シグナル伝達経路を阻害する因子は、MAG と G T 1 b との相互作用の阻害、P K C の阻害、I P<sub>3</sub> の活性化、G T 1 b と p 75 との相互作用の阻害、p 75 と R h o との相互作用の阻害、p 75 と R h o G D I との相互作用の阻害、R h o と R h o G D I との相互作用の維持または強化、R h o G D P から R h o G T P への変換阻害、R h o と R h o キナーゼとの相互作用の阻害および R h o キナーゼの活性阻害からなる群より選択される少なくとも 1 つの作用を有する、請求項 180 に記載のキット。

## 【請求項184】

前記p75シグナル伝達経路を阻害する因子は、MAGとGTPaseとの相互作用を抑制または消失する因子、PKCの阻害因子、IP<sub>3</sub>の活性化因子、GTPaseとp75との相互作用を抑制または消失する因子、p75とRho GDIとの相互作用を抑制または消失する因子、RhoとRho GDIとの相互作用を維持または強化する因子、Rho GTPからRho GTPaseへの変換を阻害する因子、RhoとRho GTPaseとの相互作用を阻害する因子、およびRho GTPaseの活性を阻害する因子からなる群より選択される少なくとも1つの因子を含み、該前記p75シグナル伝達経路を阻害する因子は、再生に有効な量で存在する、請求項180に記載のキット。

## 【請求項185】

前記p75シグナル伝達経路を阻害する因子は、Pep5ポリペプチド、Pep5ポリペプチドをコードする核酸分子、PKCの阻害因子、IP<sub>3</sub>の活性化因子、p75ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、p75ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、p75細胞外ドメインポリペプチド、p75細胞外ドメインポリペプチドをコードする核酸分子、Rho GDIポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、Rho GDIポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、Rho GDIポリペプチド、Rho GDIポリペプチドをコードする核酸分子、MAGポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、MAGポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、p21ポリペプチド、p21をコードする核酸分子、Rhoポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、Rhoポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、Rho GTPaseに対して特異的に相互作用する因子およびRho GTPaseをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子ならびにその改変体およびフラグメントからなる群より選択される少なくとも1つの分子を含む、請求項180に記載のキット。

## 【請求項186】

前記因子は、PTDドメインに結合する、請求項181に記載のキット。

## 【請求項187】

神経学的疾患を処置するための方法であって、該方法は、以下：

(a) p75シグナル伝達経路を阻害する因子を含む組成物によって再生された細胞集団を提供する工程；および

(b) 該細胞集団を該患者に移植する工程、を包含する、方法。

## 【請求項188】

前記p75シグナル伝達経路の阻害は、p75シグナル伝達経路における伝達因子もしくはその改変体もしくはフラグメント、またはp75シグナル伝達経路における伝達因子に対して特異的に相互作用する因子を再生に有効な量で前記神経細胞に提供することによる、請求項187に記載の方法。

## 【請求項189】

前記p75シグナル伝達経路における伝達因子は、MAG、PKC、IP<sub>3</sub>、GTPase、p75、Rho GDI、Rho、p21およびRho GTPaseからなる群より選択される少なくとも1つの伝達因子を含む、請求項188に記載の方法。

## 【請求項190】

前記p75シグナル伝達経路の阻害は、MAGとGTPaseとの相互作用の阻害、PKCの阻害、IP<sub>3</sub>の活性化、GTPaseとp75との相互作用の阻害、p75とRho GDIとの相互作用の維持または強化、Rho GTPからRho GTPaseへの変換阻害、RhoとRho GTPaseとの相互作用の阻害およびRho GTPaseの活性阻害からなる群より選択される、請求項187に記載の方法。

## 【請求項191】

前記 p 7 5 シグナル伝達経路の阻害は、MAG と GT 1 b との相互作用を抑制または消失する因子、PKC の阻害因子、IP<sub>3</sub> の活性化因子、GT 1 b と p 7 5 との相互作用を抑制または消失する因子、p 7 5 と R h o G D I との相互作用を抑制または消失する因子、p 7 5 と R h o との相互作用を抑制または消失する因子、R h o と R h o G D I との相互作用を維持または強化する因子、R h o G D P から R h o G T P への変換を阻害する因子、R h o と R h o キナーゼとの相互作用を阻害する因子、および R h o キナーゼの活性を阻害する因子からなる群より選択される少なくとも 1 つの因子を再生に有効な量で提供することによる、請求項 1 8 7 に記載の方法。

【請求項 1 9 2】

前記 p 7 5 シグナル伝達経路を阻害する工程は、再生に有効な量の、P e p 5 ポリペプチド、P e p 5 ポリペプチドをコードする核酸分子、PKC の阻害因子、IP<sub>3</sub> の活性化因子、p 7 5 ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、p 7 5 ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、p 7 5 細胞外ドメインポリペプチド、p 7 5 細胞外ドメインポリペプチドをコードする核酸分子、R h o G D I ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、R h o G D I ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、R h o G D I ポリペプチド、R h o G D I ポリペプチドをコードする核酸分子、MAG ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、MAG ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、p 2 1 ポリペプチド、p 2 1 をコードする核酸分子、R h o ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、R h o ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、R h o キナーゼに対して特異的に相互作用する因子および R h o キナーゼをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子ならびにその改変体およびフラグメントからなる群より選択される少なくとも 1 つの分子を含む組成物を該神経に与える工程、を包含する、請求項 1 8 7 に記載の方法。

【請求項 1 9 3】

前記因子は、PTD ドメインに結合する、請求項 1 8 8 に記載の方法。

【請求項 1 9 4】

神経再生を誘導する因子を同定するためのスクリーニング方法であって、該方法は、以下：

(a) p 7 5 シグナル伝達経路において相互作用する少なくとも 2 つの因子を、試験因子の存在下で接触させる工程、および

(b) 該少なくとも 2 つの相互作用する因子の間の相互作用レベルを、該試験因子の非存在下における相互作用レベルと比較する工程、を包含し、

ここで、該試験因子の非存在下と比較して、試験因子の存在下において相互作用が減少した場合、該試験因子は、神経を再生するための因子として同定される、方法。

【請求項 1 9 5】

前記相互作用は、MAG と GT 1 b との相互作用、GT 1 b と p 7 5 との相互作用、p 7 5 と R h o との相互作用、p 7 5 と R h o G D I との相互作用、R h o と R h o G D I との相互作用、R h o G D P から R h o G T P への変換、R h o と R h o キナーゼとの相互作用および R h o キナーゼの活性からなる群より選択される少なくとも 1 つの相互作用を含み、

前記相互作用の減少は、MAG と GT 1 b との相互作用の阻害、GT 1 b と p 7 5 との相互作用の阻害、p 7 5 と R h o との相互作用の阻害、p 7 5 と R h o G D I との相互作用の阻害、R h o と R h o G D I との相互作用の維持または強化、R h o G D P から R h o G T P への変換阻害、R h o と R h o キナーゼとの相互作用の阻害および R h o キナーゼの活性阻害からなる群より選択される少なくとも 1 つの作用を含む、請求項 1 9 4 に記載の方法。

【請求項 1 9 6】

前記少なくとも 2 つの因子は、配列番号 4 または 1 7 に少なくとも 7 0 % 相同性であるア

ミノ酸配列を有する第1のポリペプチドまたはそのフラグメントおよび配列番号6に少なくとも70%相同性であるアミノ酸配列を有する第2のポリペプチドまたはそのフラグメントを含み、

前記比較工程(b)は、該第1のポリペプチドと該第2のポリペプチドとの間の結合レベルを、該試験因子の非存在下における結合レベルと比較することを含む、請求項194に記載の方法。

【請求項197】

請求項194に記載の方法によって同定される、調節因子。

【請求項198】

請求項197に記載の調節因子を含む、薬学的組成物。

【請求項199】

神経学的疾患、障害または状態を、予防または処置する方法であって、該方法は、請求項198に記載の薬学的組成物を被験体に投与する工程を包含する、方法。

【請求項200】

MAGポリペプチドをコードする核酸分子、p75ポリペプチドをコードする核酸分子、Rho GDIポリペプチドをコードする核酸分子、Rhoをコードする核酸分子、p21をコードする核酸分子およびRhoキナーゼをコードする核酸分子からなる群より選択される少なくとも1つの核酸分子の配列において野生型とは異なる配列が導入された配列を有する核酸分子を含む、ベクター。

【請求項201】

請求項200に記載のベクターを含む、細胞。

【請求項202】

請求項200に記載のベクターを含む、組織。

【請求項203】

請求項200に記載のベクターを含む、臓器。

【請求項204】

請求項200に記載のベクターを含む、生物。

【請求項205】

請求項200に記載のベクターで形質転換された、神経改変トランスジェニック動物。

【請求項206】

MAGポリペプチドをコードする核酸分子、p75ポリペプチドをコードする核酸分子、Rho GDIポリペプチドをコードする核酸分子、Rhoをコードする核酸分子、p21をコードする核酸分子およびRhoキナーゼをコードする核酸分子からなる群より選択される少なくとも1つの核酸分子が欠失された、神経改変ノックアウト動物。

【請求項207】

神経の再生を調節する方法であって、p75シグナル伝達経路を調節する工程を含む、方法。

【請求項208】

さらに、PKCおよびIP<sub>3</sub>からなる群より選択される少なくとも1つの因子を調節する工程を包含する、請求項207に記載の方法。

【請求項209】

PKCおよびIP<sub>3</sub>の両方の因子を調節する因子をさらに包含する、請求項207に記載の方法。

【請求項210】

PKCを阻害する工程を包含する、請求項207に記載の方法。

【請求項211】

IP<sub>3</sub>を活性化する工程を包含する、請求項207に記載の方法。

【請求項212】

前記p75シグナル伝達経路の調節は、MAG、PKC、IP<sub>3</sub>、GT1b、p75、Rho GDI、Rho、p21およびRhoキナーゼからなる群より選択される少なくとも

も1つの伝達因子の調節を含む、請求項207に記載の方法。

【請求項213】

前記p75シグナル伝達経路の調節は、RhoAの調節を含む、請求項207に記載の方法。

【請求項214】

前記p75シグナル伝達経路の調節は、RhoAの活性化およびPKCの阻害を含み、前記再生の調節は再生の活性化である、請求項207に記載の方法。

【請求項215】

さらにIP<sub>3</sub>を活性化することを包含する、請求項214に記載の方法。

【請求項216】

前記PKCを調節する工程は、MAG、Nogoおよびp75からなる群より選択される少なくとも1つの因子を調節する工程を含む、請求項208に記載の方法。

【請求項217】

前記IP<sub>3</sub>を調節する工程は、MAG、Nogoおよびp75からなる群より選択される少なくとも1つの因子を調節する工程を含む、請求項208に記載の方法。

【請求項218】

前記神経の再生は、インビボまたはインビトロで行われる、請求項207に記載の方法。

【請求項219】

前記神経は、脊髄損傷、脳血管障害または脳外傷を含む状態にある、請求項207に記載の方法。

【請求項220】

前記因子は、PTDドメインに結合する、請求項208に記載の方法。

【請求項221】

神経疾患、神経障害および／または神経の状態を、処置、予防、診断または予後する方法であって、該処置、予防、診断または予後を必要とするかまたはそのことが予想される被検体において、p75シグナル伝達経路を調節する工程であって、p75シグナル伝達経路における伝達因子は、PKCおよびIP<sub>3</sub>を含む、工程を包含する、方法。

【請求項222】

さらに、PKCおよびIP<sub>3</sub>からなる群より選択される少なくとも1つの因子を調節する工程を包含する、請求項221に記載の方法。

【請求項223】

PKCおよびIP<sub>3</sub>の両方の因子を調節する因子をさらに包含する、請求項221に記載の方法。

【請求項224】

PKCを阻害する工程をさらに包含する、請求項221に記載の方法。

【請求項225】

IP<sub>3</sub>を活性化する工程をさらに包含する、請求項221に記載の方法。

【請求項226】

前記p75シグナル伝達経路の調節は、MAG、PKC、IP<sub>3</sub>、Gtlb、p75、Rho GDI、Rho、p21およびRhoキナーゼからなる群より選択される少なくとも1つの伝達因子の調節を含む、請求項221に記載の方法。

【請求項227】

前記p75シグナル伝達経路の調節は、RhoAの調節を含む、請求項221に記載の方法。

【請求項228】

前記p75シグナル伝達経路の調節は、RhoAの活性化およびPKCの阻害を含み、前記再生の調節は再生の活性化である、請求項221に記載の方法。

【請求項229】

さらにIP<sub>3</sub>を活性化することを包含する、請求項228に記載の方法。

【請求項230】

前記PKCを調節する工程は、MAG、Nog oおよびp75からなる群より選択される少なくとも1つの因子を調節する工程を含む、請求項221に記載の方法。

【請求項231】

前記IP<sub>3</sub>を調節する工程は、MAG、Nog oおよびp75からなる群より選択される少なくとも1つの因子を調節する工程を含む、請求項221に記載の方法。

【請求項232】

前記神経の再生は、インビボまたはインビトロで行われる、請求項221に記載の方法。

【請求項233】

前記神経は、脊髄損傷、脳血管障害または脳外傷を含む状態にある、請求項221に記載の方法。

【請求項234】

前記因子は、PTDドメインに結合する、請求項222に記載の方法。

【請求項235】

神経の再生を調節するための組成物であって、p75シグナル伝達経路を調節する因子を含み、ここで、p75シグナル伝達経路における伝達因子はPKCおよびIP<sub>3</sub>を含む、組成物。

【請求項236】

さらに、PKCを調節する因子およびIP<sub>3</sub>を調節する因子からなる群より選択される少なくとも1つの因子を含む、請求項235に記載の組成物。

【請求項237】

PKCを調節する因子およびIP<sub>3</sub>を調節する因子の両方をさらに含む、請求項235に記載の組成物。

【請求項238】

PKCを阻害する因子をさらに含む、請求項235に記載の組成物。

【請求項239】

IP<sub>3</sub>を活性化する因子をさらに含む、請求項235に記載の組成物。

【請求項240】

前記p75シグナル伝達経路を調節する因子は、MAG、PKC、IP<sub>3</sub>、GT1b、p75、Rho GDI、Rho、p21およびRhoキナーゼからなる群より選択される少なくとも1つの伝達因子の調節因子を含む、請求項235に記載の組成物。

【請求項241】

前記p75シグナル伝達経路を調節する因子は、RhoAの調節因子を含む、請求項235に記載の組成物。

【請求項242】

前記p75シグナル伝達経路を調節する因子は、RhoAの活性化因子およびPKCの阻害因子を含み、前記再生の調節は再生の活性化である、請求項235に記載の組成物。

【請求項243】

さらにIP<sub>3</sub>の活性化因子を含む、請求項242に記載の組成物。

【請求項244】

前記PKCの調節因子は、MAG、Nog oおよびp75からなる群より選択される、請求項236に記載の組成物。

【請求項245】

前記IP<sub>3</sub>の調節因子は、MAG、Nog oおよびp75からなる群より選択される、請求項236に記載の組成物。

【請求項246】

前記神経の再生は、インビボまたはインビトロで行われる、請求項235に記載の組成物。

【請求項247】

前記神経は、脊髄損傷、脳血管障害または脳外傷を含む状態にある、請求項235に記載の組成物。



## 【請求項 248】

前記因子は、PTDドメインに結合する、請求項 236 に記載の組成物。

## 【請求項 249】

神経疾患、神経障害および／または神経の状態を、処置、予防、診断または予後するための組成物であって、p75シグナル伝達経路を調節する因子を含む、組成物。

## 【請求項 250】

さらに、PKCを調節する因子およびIP<sub>3</sub>を調節する因子からなる群より選択される少なくとも1つの因子を含む、請求項 249 に記載の組成物。

## 【請求項 251】

PKCを調節する因子およびIP<sub>3</sub>を調節する因子の両方をさらに含む、請求項 235 に記載の組成物。

## 【請求項 252】

PKCを阻害する因子をさらに含む、請求項 249 に記載の組成物。

## 【請求項 253】

IP<sub>3</sub>を活性化する因子をさらに含む、請求項 249 に記載の組成物。

## 【請求項 254】

前記p75シグナル伝達経路を調節する因子は、MAG、PKC、IP<sub>3</sub>、GTLb、p75、RhogDI、Rhog、p21およびRhokinaseからなる群より選択される少なくとも1つの伝達因子の調節因子を含む、請求項 249 に記載の組成物。

## 【請求項 255】

前記p75シグナル伝達経路を調節する因子は、RhogAの調節因子を含む、請求項 249 に記載の組成物。

## 【請求項 256】

前記p75シグナル伝達経路を調節する因子は、RhogAの活性化因子およびPKCの阻害因子を含み、前記再生の調節は再生の活性化である、請求項 249 に記載の組成物。

## 【請求項 257】

さらにIP<sub>3</sub>の活性化因子を含む、請求項 256 に記載の組成物。

## 【請求項 258】

前記PKCの調節因子は、MAG、Nogoおよびp75からなる群より選択される、請求項 250 に記載の組成物。

## 【請求項 259】

前記IP<sub>3</sub>の調節因子は、MAG、Nogoおよびp75からなる群より選択される、請求項 250 に記載の組成物。

## 【請求項 260】

前記神経の再生は、インビボまたはインビトロで行われる、請求項 249 に記載の組成物。

## 【請求項 261】

前記神経は、脊髄損傷、脳血管障害または脳外傷を含む状態にある、請求項 249 に記載の組成物。

## 【請求項 262】

前記因子は、PTDドメインに結合する、請求項 250 に記載の組成物。

## 【書類名】明細書

## 【発明の名称】神経再生のための組成物および方法

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、神経学的疾患を処置するための薬学的組成物および方法、ならびに神経を再生する薬学的組成物および方法に関する。詳細には、神経突起伸展の阻害を破壊することによって、神経学的疾患を処置する薬学的組成物および方法に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

ニューロトロフィンレセプター (p75) は、驚くべきほど多様な生物学的効果 (例えば、細胞死、シュヴァン細胞移動、シナプス伝達の調節、ならびに感覚ニューロンおよびカルシウム流動の機能的調節が挙げられる) を媒介する (例えば、非特許文献1を参照のこと)。近年の研究において、p75は、軸索伸長の調節にも関連付けられている。神経成長因子 (NGF) は、NGFレセプターに関してp75のみを発現する胚性ラット海馬ニューロンおよびヒヨコ毛様体ニューロンからの神経突起伸展を刺激する (例えば、非特許文献2を参照のこと)。これらの効果は、p75によるRho活性の調節の説明となり得る。Rhoは、アクチン重合化の状態を調節する低分子GTPaseである。その活性化GTP結合形態において、Rhoは、アクチン細胞骨格を堅くし、それによって、軸索伸長を阻害し、そして成長円錐の崩壊を媒介する (例えば、非特許文献3および4を参照のこと)。p75へのニューロトロフィン結合は、HN10細胞および小脳ニューロンにおいてRhoAを不活性化し、一方、トランスフェクト293細胞におけるRhoAの過剰発現は、RhoAの活性化をもたらす、このことは、p75が双方向性のシグナルを誘発することを示唆する (例えば、非特許文献2を参照のこと)。実際、その後の研究によって、ミエリン由来の糖タンパク質であるミエリン結合糖タンパク質 (MAG) が、p75依存性機構でRhoAを活性化し、ゆえに、生後感覚ニューロンおよび小脳ニューロンのからの神経突起伸展を阻害することが示されている (例えば、非特許文献5を参照のこと)。さらに、Nogoおよび稀突起神経膠細胞ミエリン糖タンパク質 (OMgp)、神経突起伸展の他のミエリン由来インヒビターは、p75を介してニューロンに作用する (例えば、非特許文献6を参照のこと)。Nogoレセプターと複合体化したp75は、現在までに見出されている全ミエリン由来インヒビターに対するレセプターを形成することが示唆されている (例えば、非特許文献6および7を参照のこと)。しかし、p75によるRho活性の調節の正確な機構は、解明されるべきままの状態にある。

## 【0003】

RhoAは、酵母ツーハイブリッドシステムおよび同時免疫沈降によってp75と相互作用することが示されている (例えば、非特許文献2を参照のこと)。野生型RhoA (これは、優先的にGDP結合形態であるが、RhoAの構成性活性形態ではない) のみがp75と相互作用するので、RhoAの活性化が、RhoAおよびp75の直接的な相互作用に依存することが示唆される。GDP結合形態のRhoタンパク質は、Rho GDP解離抑制タンパク質 (Rho GDI) と相互作用する。このRho GDP解離抑制タンパク質は、ヌクレオチド解離の阻害ならびに細胞質と膜との間のRhoタンパク質の往復に役割をはたす (例えば、非特許文献8を参照のこと)。Rho GDIは、Rhoファミリーのタンパク質が、膜に転位する活性化GTP結合形態に変換されることを妨げる。さらに、Rhoタンパク質の活性形態が膜において不活性形態に変換された後、Rho GDIは、そのRhoタンパク質と複合体を形成し、そして細胞質ゾルに転位する。Rho GDIファミリーは、少なくとも3つのアイソフォーム: Rho GDI $\alpha$ 、Rho GDI $\beta$ 、およびRho GDI $\gamma$ を含む。Rho GDI $\alpha$ は、遍在的に発現し、これまで研究されているRhoファミリーのタンパク質の全てに結合し、一方、Rho GDI $\beta$ およびRho GDI $\gamma$ は、特有の組織発現パターンを示し、そしてこれらの基質特異性は、正確に決定されていない。

## 【0004】

また、神経伝達においてPKC、細胞内カルシウム濃度、IP<sub>3</sub>などの因子が関与しているようであることが知られているが、これらの因子を調節して神経再生を調節することができるかどうかは知られていない。ましてや、p75伝達経路における影響についての報告はない。

【非特許文献1】Dechant, G. & Barde, Y. A., Nat Neurosci. 5, 1131-1136 (2002)

【非特許文献2】Yamashita, T., Tucker, K. L. & Barde, Y. A., Neuron 24, 585-593 (1999)

【非特許文献3】Davies, A. M., Curr. Biol. 10, R198-200 (2000)

【非特許文献4】Schmidt, A. & Hall, A., Genes Dev. 16, 1587-1609 (2002)

【非特許文献5】Yamashita, T., Higuchi, H. & Tohyama, M., J. Cell Biol. 157, 565-570 (2002)

【非特許文献6】Wang, K. C. & Kim, J. A., Sivasankaran, R., Segal, R. & He, Z., Nature 420, 74-78 (2002)

【非特許文献7】Wong, S. T. et al., Nat Neurosci. 5, 1302-1308 (2002)

【非特許文献8】Sasaki, T. & Takai, Y., Biochem Biophys Res Commun. 245, 641-645 (1998)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

以上にかんがみて、本発明は、神経突起伸展の阻害に関連するp75とその相互作用因子との関係を明らかにすることによって、神経の再生を導き、さらにはその神経の再生に基づいて神経学的疾患を処置することを課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0006】

上記課題は、一部、本発明者らが、p75を介したシグナル伝達経路の全容を解明したことに基づいて解決された。

【0007】

本発明者らは、p75によるRho活性の正確な調節機構を報告する。興味深いことに、p75は、Rho GDI $\alpha$ からRhoAのGDP結合形態を外す活性を示す。p75と特異的に会合することが示されたペプチド(Pep5)は、p75によって媒介されるシグナルを効率的に阻害する。このペプチドは、ミエリン由来インヒビターによって誘発される成長阻害を反転させる際の有用な治療剤であり得る。

【0008】

ニューロトロフィンレセプターp75は、ニューロトロフィンならびにいくつかのミエリン成分(ミエリン結合糖タンパク質、Nogoおよび稀突起神経膠細胞ミエリン糖タンパク質を含む)による軸索伸長の調節に関与する。ニューロトロフィンは、Rho活性を阻害することによって神経突起伸展を刺激し、一方、ミエリン由来タンパク質は、RhoAを活性化し、これらの両方ともが、p75依存性機構を介する。ここで、本発明者らは、Rho GDP解離抑制タンパク質とp75との直接的な相互作用が、RhoAの活性化を開始することを示す。p75とRho GDIとの相互作用は、ミエリン結合タンパク質またはNogoによって強化される。p75は、Rho GDP解離抑制タンパク質からのプレニル化RhoAの離脱を促進する。p75の6個の $\alpha$ -ヘリックスのうちの5番目と会合することが示されたペプチドリガンドは、Rho GDP解離抑制タンパク質とp75との間の相互作用を阻害し、従ってp75によって媒介される作用をサイレンシングする。このペプチドは、中枢神経系の再生欠如の一因となる阻害合図に対する治療剤

としての可能性を有する。従って、p 75 と R h o G D I との間の相互作用を破壊する因子は、中枢神経系の再生欠如の一因となる阻害合図に対する治療剤としての可能性、すなわち脊髄損傷、アルツハイマー病、脳梗塞、脳出血、脳外傷などの治療剤としての可能性を有する。

【0009】

このように、いくつかのミエリン由来タンパク質が、成体脊椎動物の CNS 中の軸索再生を妨害する中枢神経系 (CNS) ミエリンの成分であると同定されている。R h o A の活性化は、これらのタンパク質のシグナル伝達機構の重要な部分であることが示されている。さらに、本発明者らは、これらのタンパク質が軸索伸展を促進するかまたは阻害するかを決定する、さらなるシグナルをも同定した。ミエリン結合糖タンパク質 (MAG) および N o g o は、細胞内  $Ca^{2+}$  上昇および P K C の活性化を誘発し、これはおそらく、G i によって媒介される。MAG または N o g o による軸索伸展阻害および成長円錐の破壊は、P K C の阻害によって軸索伸長および成長円錐の拡大に変わり得るが、イノシトール 1, 4, 5-三リン酸 ( $IP_3$ ) の阻害によっては変わらない。逆に、MAG によって促進される未成熟ニューロンの軸索成長は、 $IP_3$  を阻害することによって破壊される。R h o A の活性化は、P K C 非依存性である。従って、P K C と  $IP_3$  との間のバランスは、ミエリン由来タンパク質による軸索再生の双方向調節に対して重要であり得ることが判明した。したがって、本発明は、P K C と  $IP_3$  との間のバランスをとることによって、p 75 シグナル伝達経路の調節による神経再生の調節をさらに、コントロールすることができることが判明した。このように P K C および/または  $IP_3$  の調節は、他の p 75 シグナル伝達経路の調節による神経再生の促進または阻害を増強または抑制することができる、よりきめ細かい神経再生のシステムを提供することができる。

【0010】

従って、本発明は、以下を提供する。

【0011】

(1) 神経を再生するための方法であって、p 75 シグナル伝達経路を阻害する工程を含む、方法。

【0012】

(2) 上記 p 75 シグナル伝達経路は、神経再生が所望される部位における神経細胞のものである、項目 1 に記載の方法。

【0013】

(3) 上記 p 75 シグナル伝達経路の阻害は、p 75 シグナル伝達経路における伝達因子もしくはその改変体もしくはフラグメント、または p 75 シグナル伝達経路における伝達因子に対して特異的に相互作用する因子を再生に有効な量で提供することによる、項目 1 に記載の方法。

【0014】

(4) 上記 p 75 シグナル伝達経路における伝達因子は、MAG、P K C、 $IP_3$ 、G T 1 b、p 75、R h o G D I、R h o、p 21 および R h o キナーゼからなる群より選択される少なくとも 1 つの伝達因子を含む、項目 3 に記載の方法。

【0015】

(5) 上記 p 75 シグナル伝達経路の阻害は、MAG と G T 1 b との相互作用の阻害、P K C の阻害、 $IP_3$  の活性化、G T 1 b と p 75 との相互作用の阻害、p 75 と R h o との相互作用の阻害、p 75 と R h o G D I との相互作用の阻害、R h o と R h o G D I との相互作用の維持または強化、R h o G D P から R h o G T P への変換阻害、R h o と R h o キナーゼとの相互作用の阻害および R h o キナーゼの活性阻害からなる群より選択される、項目 1 に記載の方法。

【0016】

(6) 上記 p 75 シグナル伝達経路の阻害は、MAG と G T 1 b との相互作用を抑制または消失する因子、P K C の阻害因子、 $IP_3$  の活性化因子、G T 1 b と p 75 との相互作用を抑制または消失する因子、p 75 と R h o G D I との相互作用を抑制または消

失する因子、p 7 5 と R h o との相互作用を抑制または消失する因子、R h o と R h o G D I との相互作用を維持または強化する因子、R h o G D P から R h o G T P への変換を阻害する因子、R h o と R h o キナーゼとの相互作用を阻害する因子、および R h o キナーゼの活性を阻害する因子からなる群より選択される少なくとも 1 つの因子を再生に有効な量で提供することによる、項目 1 に記載の方法。

**【0017】**

(7) 上記神経の再生は、インビボまたはインビトロで行われる、項目 1 に記載の方法。

**【0018】**

(8) 上記神経は、脊髄損傷、脳血管障害または脳外傷を含む状態にある、項目 1 に記載の方法。

**【0019】**

(9) 上記 p 7 5 シグナル伝達経路を阻害する工程は、再生に有効な量の、P e p 5 ポリペプチド、P e p 5 ポリペプチドをコードする核酸分子、P K C の阻害因子、I P <sub>3</sub> の活性化因子、p 7 5 ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、p 7 5 ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、p 7 5 細胞外ドメインポリペプチド、p 7 5 細胞外ドメインポリペプチドをコードする核酸分子、R h o G D I する核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、R h o G D I ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、R h o G D I ポリペプチド、R h o G D I ポリペプチドをコードする核酸分子、M A G ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、M A G ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、p 2 1 ポリペプチド、p 2 1 をコードする核酸分子、R h o ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、R h o キナーゼに対して特異的に相互作用する因子および R h o キナーゼをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子ならびにその改変体およびフラグメントからなる群より選択される少なくとも 1 つの分子を含む組成物を上記神経に与える工程、を包含する、項目 1 に記載の方法。

**【0020】**

(10) 上記因子は、P T D ドメインに結合する、項目 4 に記載の方法。

**【0021】**

(11) 神経疾患、神経障害および／または神経の状態を、処置、予防、診断または予後する方法であって、上記処置、予防、診断または予後を必要とするかまたはそのことが予想される被検体において p 7 5 シグナル伝達経路を調節する工程を包含する、方法。

**【0022】**

(12) 上記 p 7 5 シグナル伝達経路を調節する工程は、p 7 5 シグナル伝達経路における伝達因子もしくはその改変体もしくはフラグメント、または p 7 5 シグナル伝達経路における伝達因子に対して特異的に相互作用する因子を再生に有効な量で、上記処置、予防、診断または予後を必要とするかまたはそのことが予想される被検体に投与する工程を包含する、項目 1 に記載の方法。

**【0023】**

(13) 上記 p 7 5 シグナル伝達経路における伝達因子は、M A G、P K C、I P <sub>3</sub>、G T 1 b、p 7 5、R h o G D I、R h o、p 2 1 および R h o キナーゼからなる群より選択される少なくとも 1 つの伝達因子を含む、項目 1 に記載の方法。

**【0024】**

(14) 上記 p 7 5 シグナル伝達経路の調節は、上記処置、予防、診断または予後を必要とするかまたはそのことが予想される被検体における、M A G と G T 1 b との相互作用の阻害、P K C の阻害、I P <sub>3</sub> の活性化、G T 1 b と p 7 5 との相互作用の阻害、p 7 5 と R h o との相互作用の阻害、p 7 5 と R h o G D I との相互作用の阻害、R h o と R h o G D I との相互作用の維持または強化、R h o G D P から R h o G T P への変換

阻害、R h o と R h o キナーゼとの相互作用の阻害および R h o キナーゼの活性阻害からなる群より選択される調節を少なくとも 1 つ包含する、項目 1 1 に記載の方法。

【0025】

(15) 上記 p 7 5 シグナル伝達経路の調節は、M A G と G T 1 b との相互作用を抑制または消失する因子、P K C の阻害因子、I P <sub>3</sub> の活性化因子、G T 1 b と p 7 5 との相互作用を抑制または消失する因子、p 7 5 と R h o G D I との相互作用を抑制または消失する因子、p 7 5 と R h o との相互作用を抑制または消失する因子、R h o と R h o G D I との相互作用を維持または強化する因子、R h o G D P から R h o G T P への変換を阻害する因子、R h o と R h o キナーゼとの相互作用を阻害する因子、および R h o キナーゼの活性を阻害する因子からなる群より選択される少なくとも 1 つの因子を再生に有効な量で、上記処置、予防、診断または予後を必要とするかまたはそのことが予想される被検体に投与する工程を包含する、項目 1 1 に記載の方法。

【0026】

(16) 上記神経の再生は、インビボまたはインビトロで行われる、項目 1 1 に記載の方法。

【0027】

(17) 上記神経は、脊髄損傷、脳血管障害または脳外傷を含む状態にある、項目 1 1 に記載の方法。

【0028】

(18) 上記 p 7 5 シグナル伝達経路を調節する工程は、診断、予防、処置または予後に有効な量の P e p 5 ポリペプチド、P e p 5 ポリペプチドをコードする核酸分子、P K C の阻害因子、I P <sub>3</sub> の活性化因子、p 7 5 ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、p 7 5 ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、p 7 5 細胞外ドメインポリペプチド、p 7 5 細胞外ドメインポリペプチドをコードする核酸分子、R h o G D I ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、R h o G D I ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、R h o G D I ポリペプチド、R h o G D I ポリペプチドをコードする核酸分子、M A G ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、M A G ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、p 2 1 ポリペプチド、p 2 1 をコードする核酸分子、R h o ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、R h o ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、R h o キナーゼに対して特異的に相互作用する因子および R h o キナーゼをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子ならびにその改変体およびフラグメントからなる群より選択される少なくとも 1 つの分子を含む組成物を上記神経に与える工程、を包含する、項目 1 1 に記載の方法。

【0029】

(19) さらに、1 以上のさらなる薬剤を提供する工程を包含する、項目 1 1 に記載の方法。

【0030】

(20) 上記因子は、P T D ドメインに結合する、項目 1 3 に記載の方法。

【0031】

(21) p 7 5 シグナル伝達経路を阻害する因子を含む、神経を再生するための組成物。

【0032】

(22) 上記 p 7 5 シグナル伝達経路を阻害する因子は、神経再生が所望される部位における神経細胞に送達されるのに適切な形態である、項目 2 1 に記載の組成物。

【0033】

(23) 上記 p 7 5 シグナル伝達経路を阻害する因子は、p 7 5 シグナル伝達経路における伝達因子もしくはその改変体もしくはフラグメント、または p 7 5 シグナル伝達経路における伝達因子に対して特異的に相互作用する因子を含む、項目 2 1 に記載の組成物

。

## 【0034】

(24) 上記 p 7 5 シグナル伝達経路における伝達因子は、MAG、PKC、IP<sub>3</sub>、G T 1 b、p 7 5、R h o G D I、R h o、p 2 1 および R h o キナーゼからなる群より選択される少なくとも 1 つの伝達因子を含む、項目 2 3 に記載の組成物。

## 【0035】

(25) 上記 p 7 5 シグナル伝達経路を阻害する因子は、MAG と G T 1 b との相互作用の阻害、PKC の阻害、IP<sub>3</sub> の活性化、G T 1 b と p 7 5 との相互作用の阻害、p 7 5 と R h o との相互作用の阻害、p 7 5 と R h o G D I との相互作用の阻害、R h o と R h o G D I との相互作用の維持または強化、R h o G D P から R h o G T P への変換阻害、R h o と R h o キナーゼとの相互作用の阻害および R h o キナーゼの活性阻害からなる群より選択される少なくとも 1 つの作用を有する、項目 2 1 に記載の組成物。

## 【0036】

(26) 上記 p 7 5 シグナル伝達経路を阻害する因子は、MAG と G T 1 b との相互作用を抑制または消失する因子、PKC の阻害因子、IP<sub>3</sub> の活性化因子、G T 1 b と p 7 5 との相互作用を抑制または消失する因子、p 7 5 と R h o G D I との相互作用を抑制または消失する因子、p 7 5 と R h o との相互作用を抑制または消失する因子、R h o と R h o G D I との相互作用を維持または強化する因子、R h o G D P から R h o G T P への変換を阻害する因子、R h o と R h o キナーゼとの相互作用を阻害する因子、および R h o キナーゼの活性を阻害する因子からなる群より選択される少なくとも 1 つの因子を含み、上記 p 7 5 シグナル伝達経路を阻害する因子は、再生に有効な量で存在する、項目 2 1 に記載の組成物。

## 【0037】

(27) インビボまたはインビトロでの投与形態に適切である、項目 2 1 に記載の組成物。

## 【0038】

(28) 上記神経は、脊髄損傷、脳血管障害または脳外傷を含む状態にある、項目 2 1 に記載の組成物。

## 【0039】

(29) 上記 p 7 5 シグナル伝達経路を阻害する因子は、P e p 5 ポリペプチド、P e p 5 ポリペプチドをコードする核酸分子、PKC の阻害因子、IP<sub>3</sub> の活性化因子、p 7 5 ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、p 7 5 ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、p 7 5 細胞外ドメインポリペプチド、p 7 5 細胞外ドメインポリペプチドをコードする核酸分子、R h o G D I ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、R h o G D I ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、R h o G D I ポリペプチド、R h o G D I ポリペプチドをコードする核酸分子、MAG ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、MAG ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、p 2 1 ポリペプチド、p 2 1 をコードする核酸分子、R h o ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、R h o ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、R h o キナーゼに対して特異的に相互作用する因子および R h o キナーゼをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子ならびにその改変体およびフラグメントからなる群より選択される少なくとも 1 つの分子を含む、項目 2 1 に記載の組成物。

## 【0040】

(30) 上記因子は、P T D ドメインに結合する、項目 2 1 に記載の組成物。

## 【0041】

(31) 神経疾患、神経障害および／または神経の状態を、処置、予防、診断または予後するための組成物であって、p 7 5 シグナル伝達経路を調節する因子を含む、組成物。

。

## 【0042】

(32) 上記 p 7 5 シグナル伝達経路を調節する因子は、p 7 5 シグナル伝達経路における伝達因子もしくはその改変体もしくはフラグメント、または p 7 5 シグナル伝達経路における伝達因子に対して特異的に相互作用する因子を含む、項目 3 1 に記載の組成物。

【0043】

(33) 上記 p 7 5 シグナル伝達経路における伝達因子は、MAG、PKC、IP<sub>3</sub>、G T 1 b、p 7 5、R h o G D I、R h o、p 2 1 および R h o キナーゼからなる群より選択される少なくとも 1 つの伝達因子を含む、項目 3 1 に記載の組成物。

【0044】

(34) 上記 p 7 5 シグナル伝達経路の調節は、MAG と G T 1 b との相互作用の阻害、PKC の阻害、IP<sub>3</sub> の活性化、G T 1 b と p 7 5 との相互作用の阻害、p 7 5 と R h o G D I との相互作用の阻害、R h o と R h o G D I との相互作用の維持または強化、R h o G D P から R h o G T P への変換阻害、R h o と R h o キナーゼとの相互作用の阻害および R h o キナーゼの活性阻害からなる群より選択される、項目 3 1 に記載の組成物。

【0045】

(35) 上記 p 7 5 シグナル伝達経路を調節する因子は、MAG と G T 1 b との相互作用を抑制または消失する因子、PKC の阻害因子、IP<sub>3</sub> の活性化因子、G T 1 b と p 7 5 との相互作用を抑制または消失する因子、p 7 5 と R h o G D I との相互作用を抑制または消失する因子、p 7 5 と R h o との相互作用を抑制または消失する因子、R h o と R h o G D I との相互作用を維持または強化する因子、R h o G D P から R h o G T P への変換を阻害する因子、R h o と R h o キナーゼとの相互作用を阻害する因子、および R h o キナーゼの活性を阻害する因子からなる群より選択される少なくとも 1 つの因子を含む、項目 3 1 に記載の組成物。

【0046】

(36) 経口または非経口での投与に適した形態である、項目 3 1 に記載の組成物。

【0047】

(37) 上記神経は、脊髄損傷、脳血管障害または脳外傷を含む状態にある、項目 3 1 に記載の組成物。

【0048】

(38) 上記 p 7 5 シグナル伝達経路を調節する因子は、P e p 5 ポリペプチド、P e p 5 ポリペプチドをコードする核酸分子、PKC の阻害因子、IP<sub>3</sub> の活性化因子、p 7 5 ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、p 7 5 ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、p 7 5 細胞外ドメインポリペプチド、p 7 5 細胞外ドメインポリペプチドをコードする核酸分子、R h o G D I ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、R h o G D I ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、R h o G D I ポリペプチドをコードする核酸分子、MAG ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、MAG ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、p 2 1 ポリペプチド、p 2 1 をコードする核酸分子、R h o ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、R h o ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、R h o キナーゼに対して特異的に相互作用する因子および R h o キナーゼをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子ならびにその改変体およびフラグメントからなる群より選択される少なくとも 1 つの分子を含む、項目 3 1 に記載の組成物。

【0049】

(39) さらに、1 以上のさらなる薬剤を含む、項目 3 1 に記載の組成物。

【0050】

(40) 上記因子は、P T D ドメインに結合する、項目 3 1 に記載の組成物。

【0051】

(41) 神経を再生するための組成物であって、P e p 5 ポリペプチドを含む、組成



物。

【0052】

(42) 上記 Pep5 ポリペプチドは、

(a) 配列番号1に記載の核酸配列もしくはそのフラグメントによってコードされる、ポリペプチド；

(b) 配列番号2に記載のアミノ酸配列もしくはそのフラグメントを有する、ポリペプチド；

(c) 配列番号2に記載のアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が、置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも1つの変異を有する改変体ポリペプチドであって、生物学的活性を有する、改変体ポリペプチド；または

(d) (a) ~ (c) のいずれか1つのポリペプチドのアミノ酸配列に対する同一性が少なくとも70%であるアミノ酸配列からなり、かつ、生物学的活性を有する、ポリペプチド、

を含む、項目41に記載の組成物。

【0053】

(43) 上記 Pep5 ポリペプチドは、配列番号2のアミノ酸配列の全範囲を含む、項目41に記載の組成物。

【0054】

(44) 上記神経は、脊髄損傷、脳血管障害または脳外傷を含む状態にある、項目41に記載の組成物。

【0055】

(45) 上記 Pep5 ポリペプチドは、さらに、PTDドメインを含む、項目41に記載の組成物。

【0056】

(46) 神経を再生するための組成物であって、Pep5 ポリペプチドをコードする核酸分子を含む、組成物。

【0057】

(47) 上記 Pep5 ポリペプチドをコードする核酸分子は、

(a) 配列番号1に記載の塩基配列またはそのフラグメント配列を有する、ポリヌクレオチド；

(b) 配列番号2に記載のアミノ酸配列またはそのフラグメントをコードする、ポリヌクレオチド、

(c) 配列番号2に記載のアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が、置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも1つの変異を有する改変体ポリペプチドであって、生物学的活性を有する改変体ポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチド；

(d) (a) ~ (c) のいずれか1つのポリヌクレオチドにストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；または

(e) (a) ~ (c) のいずれか1つのポリヌクレオチドまたはその相補配列に対する同一性が少なくとも70%である塩基配列からなり、かつ、生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、を含む、項目46に記載の組成物。

【0058】

(48) 上記 Pep5 ポリペプチドをコードする核酸分子は、配列番号1の核酸配列におけるヌクレオチド配列の全範囲を含む、項目46に記載の組成物。

【0059】

(49) 上記神経は、脊髄損傷、脳血管障害または脳外傷を含む状態にある、項目46に記載の組成物。

【0060】

(50) 上記 P e p 5 ポリペプチドをコードする核酸分子は、P T D ドメインをコードする配列を含む、項目 4 1 に記載の組成物。

【0061】

(51) 神経を再生するための組成物であって、p 7 5 ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子を含む、組成物。

【0062】

(52) 上記 p 7 5 ポリペプチドは、

(a) 配列番号 3 または 1 6 に記載の核酸配列のヌクレオチドもしくはそのフラグメントによってコードされる、ポリペプチド；

(b) 配列番号 4 または 1 7 に記載のアミノ酸配列のアミノ酸もしくはそのフラグメントを有する、ポリペプチド；

(c) 配列番号 4 または 1 7 に記載のアミノ酸配列のアミノ酸において、1 以上のアミノ酸が、置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも 1 つの変異を有する改変体ポリペプチドであって、生物学的活性を有する、改変体ポリペプチド

(d) 配列番号 3 または 1 6 に記載の塩基配列のヌクレオチドのスプライス改変体もしくは対立遺伝子改変体によってコードされる、ポリペプチド；

(e) 配列番号 4 または 1 7 に記載のアミノ酸配列のアミノ酸を有するポリペプチドの、種相同体ポリペプチド；または

(f) (a) ~ (e) のいずれか 1 つのポリペプチドのアミノ酸配列に対する同一性が少なくとも 70 % であるアミノ酸配列からなり、かつ、生物学的活性を有する、ポリペプチド、を含む、項目 5 1 に記載の組成物。

【0063】

(53) 上記 p 7 5 ポリペプチドは、配列番号 4 または 1 7 のアミノ酸配列のうち、それぞれ 2 7 3 位 ~ 4 2 7 位または 2 7 4 位 ~ 4 2 5 位の範囲を含む、項目 5 1 に記載の組成物。

【0064】

(54) 上記神経は、脊髄損傷、脳血管障害または脳外傷を含む状態にある、項目 5 1 に記載の組成物。

【0065】

(55) 上記因子は、抗体を含む、項目 5 1 に記載の組成物。

【0066】

(56) 神経を再生するための組成物であって、p 7 5 ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子を含む、組成物。

【0067】

(57) 上記 p 7 5 ポリペプチドをコードする核酸分子は、

(a) 配列番号 3 または 1 6 に記載の塩基配列のヌクレオチドまたはそのフラグメント配列を有する、ポリヌクレオチド；

(b) 配列番号 4 または 1 7 に記載のアミノ酸配列のアミノ酸またはそのフラグメントをコードする、ポリヌクレオチド、

(c) 配列番号 4 または 1 7 に記載のアミノ酸配列のアミノ酸において、1 以上のアミノ酸が、置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも 1 つの変異を有する改変体ポリペプチドであって、生物学的活性を有する改変体ポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチド；

(d) 配列番号 3 または 1 6 に記載の塩基配列のヌクレオチドのスプライス変異体または対立遺伝子変異体である、ポリヌクレオチド；

(e) 配列番号 4 または 1 7 に記載のアミノ酸配列のアミノ酸からなるポリペプチドの種相同体をコードする、ポリヌクレオチド；

(f) (a) ~ (e) のいずれか 1 つのポリヌクレオチドにストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌク

レオチド;または

(g) (a) ~ (e) のいずれか1つのポリヌクレオチドまたはその相補配列に対する同一性が少なくとも70%である塩基配列からなり、かつ、生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、  
からなる群より選択される、ポリヌクレオチド、  
を含む、項目56に記載の組成物。

【0068】

(58) 上記p75ポリペプチドをコードする核酸分子は、配列番号3または16の核酸配列において、それぞれヌクレオチド1110位~1283位または1113位~1277位の範囲を含む、項目56に記載の組成物。

【0069】

(59) 上記神経は、脊髄損傷、脳血管障害または脳外傷を含む状態にある、項目56に記載の組成物。

【0070】

(60) 上記因子は、p75ポリペプチドをコードする核酸分子のアンチセンスまたはRNAiである、項目56に記載の組成物。

【0071】

(61) 神経を再生するための組成物であって、p75細胞外ドメインポリペプチドを含む、組成物。

【0072】

(62) 上記p75細胞外ドメインは、

(a) 配列番号3または16に記載の核酸配列の、それぞれヌクレオチド198位~863位または201位~866位もしくはそのフラグメントによってコードされる、ポリペプチド;

(b) 配列番号4または17に記載のアミノ酸配列の、それぞれアミノ酸29位~250位または30位~251位もしくはそのフラグメントを有する、ポリペプチド;

(c) 配列番号4または17に記載のアミノ酸配列、それぞれアミノ酸29位~250位または30位~251位において、1以上のアミノ酸が、置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも1つの変異を有する改変体ポリペプチドであって、生物学的活性を有する、改変体ポリペプチド

(d) 配列番号3または16に記載の塩基配列の、それぞれヌクレオチド198位~863位または201位~866位のスプライス改変体もしくは対立遺伝子改変体の配列によってコードされる、ポリペプチド;

(e) 配列番号4または17に記載のアミノ酸配列の、それぞれアミノ酸29位~250位または30位~251位を有するポリペプチドの、種相同体ポリペプチド;または

(f) (a) ~ (e) のいずれか1つのポリペプチドのアミノ酸配列に対する同一性が少なくとも70%であるアミノ酸配列からなり、かつ、生物学的活性を有する、ポリペプチド、  
を含む、項目61に記載の組成物。

【0073】

(63) 上記p75細胞外ドメインポリペプチドは、配列番号4または17のアミノ酸配列において、それぞれアミノ酸29位~250位または30位~251位の範囲を含む、項目61に記載の組成物。

【0074】

(64) 上記神経は、脊髄損傷、脳血管障害または脳外傷を含む状態にある、項目61に記載の組成物。

【0075】

(65) 上記p75細胞外ドメインポリペプチドは、可溶性である、項目61に記載の組成物。

## 【0076】

(66) 神経を再生するための組成物であって、p 75細胞外ドメインポリペプチドをコードする核酸分子を含む、組成物。

## 【0077】

(67) 上記 p 75細胞外ドメインポリペプチドをコードする核酸分子は、

(a) 配列番号 3 または 16 に記載の塩基配列の、それぞれヌクレオチド 198 位～863 位または 201 位～866 位またはそのフラグメント配列を有する、ポリヌクレオチド；

(b) 配列番号 4 または 17 に記載のアミノ酸配列の、それぞれアミノ酸 29 位～250 位または 30 位～251 位またはそのフラグメントをコードする、ポリヌクレオチド、

(c) 配列番号 4 または 17 に記載のアミノ酸配列の、それぞれアミノ酸 29 位～250 位または 30 位～251 位において、1 以上のアミノ酸が、置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも 1 つの変異を有する改変体ポリペプチドであって、生物学的活性を有する改変体ポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチド；

(d) 配列番号 3 または 16 に記載の塩基配列の、それぞれヌクレオチド 198 位～863 位または 201 位～866 位のスプライス変異体または対立遺伝子変異体である、ポリヌクレオチド；

(e) 配列番号 4 または 17 に記載のアミノ酸配列、それぞれアミノ酸 29 位～250 位または 30 位～251 位からなるポリペプチドの種相同体をコードする、ポリヌクレオチド；

(f) (a) ～ (e) のいずれか 1 つのポリヌクレオチドにストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；または

(g) (a) ～ (e) のいずれか 1 つのポリヌクレオチドまたはその相補配列に対する同一性が少なくとも 70 % である塩基配列からなり、かつ、生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、からなる群より選択される、ポリヌクレオチド、を含む、項目 66 に記載の組成物。

## 【0078】

(68) 上記 p 75細胞外ドメインポリペプチドをコードする核酸分子は、配列番号 3 または 16 の核酸配列において、それぞれヌクレオチド 198 位～863 位または 201 位～866 位の範囲を含む、項目 66 に記載の組成物。

## 【0079】

(69) 上記神経は、脊髄損傷、脳血管障害または脳外傷を含む状態にある、項目 66 に記載の組成物。

## 【0080】

(70) 上記 p 75細胞外ドメインポリペプチドは、可溶性である、項目 66 に記載の組成物。

## 【0081】

(71) 神経を再生するための組成物であって、R h o G D I ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子を含む、組成物。

## 【0082】

(72) 上記 R h o G D I ポリペプチドは、

(a) 配列番号 5 に記載の核酸配列のヌクレオチドもしくはそのフラグメントによってコードされる、ポリペプチド；

(b) 配列番号 6 に記載のアミノ酸配列のアミノ酸もしくはそのフラグメントを有する、ポリペプチド；

(c) 配列番号 6 に記載のアミノ酸配列のアミノ酸において、1 以上のアミノ酸が、置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも 1 つの変異を有する改変体

ポリペプチドであって、生物学的活性を有する、改変体ポリペプチド

(d) 配列番号 5 に記載の塩基配列のヌクレオチドのスプライス改変体もしくは対立遺伝子改変体によってコードされる、ポリペプチド;

(e) 配列番号 6 に記載のアミノ酸配列のアミノ酸を有するポリペプチドの、種相同体ポリペプチド; または

(f) (a) ~ (e) のいずれか 1 つのポリペプチドのアミノ酸配列に対する同一性が少なくとも 70 % であるアミノ酸配列からなり、かつ、生物学的活性を有する、ポリペプチド、

を含む、項目 71 に記載の組成物。

【0083】

(73) 上記 R h o G D I ポリペプチドは、配列番号 6 のアミノ酸配列の全範囲を含む、項目 71 に記載の組成物。

【0084】

(74) 上記神経は、脊髄損傷、脳血管障害または脳外傷を含む状態にある、項目 71 に記載の組成物。

【0085】

(75) 上記因子は、抗体を含む、項目 71 に記載の組成物。

【0086】

(76) 神経を再生するための組成物であって、R h o G D I ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子を含む、組成物。

【0087】

(77) 上記 R h o G D I ポリペプチドをコードする核酸分子は、

(a) 配列番号 5 に記載の塩基配列のヌクレオチドまたはそのフラグメント配列を有する、ポリヌクレオチド;

(b) 配列番号 6 に記載のアミノ酸配列のアミノ酸またはそのフラグメントをコードする、ポリヌクレオチド、

(c) 配列番号 6 に記載のアミノ酸配列のアミノ酸において、1 以上のアミノ酸が、置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも 1 つの変異を有する改変体ポリペプチドであって、生物学的活性を有する改変体ポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチド;

(d) 配列番号 5 に記載の塩基配列のヌクレオチドのスプライス変異体または対立遺伝子変異体である、ポリヌクレオチド;

(e) 配列番号 6 に記載のアミノ酸配列のアミノ酸からなるポリペプチドの種相同体をコードする、ポリヌクレオチド;

(f) (a) ~ (e) のいずれか 1 つのポリヌクレオチドにストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド; または

(g) (a) ~ (e) のいずれか 1 つのポリヌクレオチドまたはその相補配列に対する同一性が少なくとも 70 % である塩基配列からなり、かつ、生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、

からなる群より選択される、ポリヌクレオチド、  
を含む、項目 76 に記載の組成物。

【0088】

(78) 上記 R h o G D I は、配列番号 5 の核酸配列の全範囲を含む、項目 76 に記載の組成物。

【0089】

(79) 上記神経は、脊髄損傷、脳血管障害または脳外傷を含む状態にある、項目 76 に記載の組成物。

【0090】

(80) 上記因子は、アンチセンス分子または RNA i を含む、項目 76 に記載の組

成物。

【0091】

(81) 神経を再生するための組成物であって、MAGポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子を含む、組成物。

【0092】

(82) 上記MAGポリペプチドは、

(a) 配列番号7に記載の核酸配列もしくはそのフラグメントによってコードされる、ポリペプチド；

(b) 配列番号8に記載のアミノ酸配列もしくはそのフラグメントを有する、ポリペプチド；

(c) 配列番号8に記載のアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が、置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも1つの変異を有する改変体ポリペプチドであって、生物学的活性を有する、改変体ポリペプチド

(d) 配列番号7に記載の塩基配列のスプライス改変体もしくは対立遺伝子改変体によってコードされる、ポリペプチド；

(e) 配列番号8に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドの、種相同体ポリペプチド；または

(f) (a)～(e)のいずれか1つのポリペプチドのアミノ酸配列に対する同一性が少なくとも70%であるアミノ酸配列からなり、かつ、生物学的活性を有する、ポリペプチド、

を含む、項目81に記載の組成物。

【0093】

(83) 上記MAGポリペプチドは、配列番号8のアミノ酸配列の1位～626位を含む、項目81に記載の組成物。

【0094】

(84) 上記神経は、脊髄損傷、脳血管障害または脳外傷を含む状態にある、項目81に記載の組成物。

【0095】

(85) 上記因子は、抗体を含む、項目81に記載の組成物。

【0096】

(86) 神経を再生するための組成物であって、MAGポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子を含む、組成物。

【0097】

(87) 上記MAGポリペプチドをコードする核酸分子は、

(a) 配列番号7に記載の塩基配列のヌクレオチドまたはそのフラグメント配列を有する、ポリヌクレオチド；

(b) 配列番号8に記載のアミノ酸配列のアミノ酸またはそのフラグメントをコードする、ポリヌクレオチド、

(c) 配列番号8に記載のアミノ酸配列のアミノ酸において、1以上のアミノ酸が、置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも1つの変異を有する改変体ポリペプチドであって、生物学的活性を有する改変体ポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチド；

(d) 配列番号7に記載の塩基配列のヌクレオチドのスプライス変異体または対立遺伝子変異体である、ポリヌクレオチド；

(e) 配列番号8に記載のアミノ酸配列のアミノ酸からなるポリペプチドの種相同体をコードする、ポリヌクレオチド；

(f) (a)～(e)のいずれか1つのポリヌクレオチドにストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；または

(g) (a)～(e)のいずれか1つのポリヌクレオチドまたはその相補配列に対

する同一性が少なくとも70%である塩基配列からなり、かつ、生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、  
からなる群より選択される、ポリヌクレオチド、  
を含む、項目86に記載の組成物。

【0098】

(88) 上記MAGポリペプチドをコードする核酸分子は、配列番号7の核酸配列において、1位～2475位の範囲を含む、項目86に記載の組成物。

【0099】

(89) 上記神経は、脊髄損傷、脳血管障害または脳外傷を含む状態にある、項目86に記載の組成物。

【0100】

(90) 上記因子は、MAGポリペプチドをコードする核酸分子のアンチセンスまたはRNAiである、項目86に記載の組成物。

【0101】

(91) 神経を再生するための組成物であって、Rhοポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子を含む、組成物。

【0102】

(92) 上記Rhοポリペプチドは、

(a) 配列番号11に記載の核酸配列のヌクレオチドもしくはそのフラグメントによってコードされる、ポリペプチド；

(b) 配列番号12に記載のアミノ酸配列のアミノ酸もしくはそのフラグメントを有する、ポリペプチド；

(c) 配列番号12に記載のアミノ酸配列のアミノ酸において、1以上のアミノ酸が、置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも1つの変異を有する改変体ポリペプチドであって、生物学的活性を有する、改変体ポリペプチド

(d) 配列番号11に記載の塩基配列のヌクレオチドのスプライス改変体もしくは対立遺伝子改変体によってコードされる、ポリペプチド；

(e) 配列番号12に記載のアミノ酸配列のアミノ酸を有するポリペプチドの、種相同体ポリペプチド；または

(f) (a)～(e)のいずれか1つのポリペプチドのアミノ酸配列に対する同一性が少なくとも70%であるアミノ酸配列からなり、かつ、生物学的活性を有する、ポリペプチド、

を含む、項目91に記載の組成物。

【0103】

(93) 上記Rhοポリペプチドは、配列番号12のアミノ酸の1位～193位を含む、項目91に記載の組成物。

【0104】

(94) 上記神経は、脊髄損傷、脳血管障害または脳外傷を含む状態にある、項目91に記載の組成物。

【0105】

(95) 上記因子は、抗体を含む、項目91に記載の組成物。

【0106】

(96) 神経を再生するための組成物であって、Rhοポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子を含む、組成物。

【0107】

(97) 上記Rhοポリペプチドをコードする核酸分子は、

(a) 配列番号11に記載の塩基配列のヌクレオチドまたはそのフラグメント配列を有する、ポリヌクレオチド；

(b) 配列番号12に記載のアミノ酸配列のアミノ酸またはそのフラグメントをコードする、ポリヌクレオチド、

(c) 配列番号 12 に記載のアミノ酸配列のアミノ酸において、1 以上のアミノ酸が、置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも 1 つの変異を有する改変体ポリペプチドであって、生物学的活性を有する改変体ポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチド;

(d) 配列番号 11 に記載の塩基配列のヌクレオチドのスプライス変異体または対立遺伝子変異体である、ポリヌクレオチド;

(e) 配列番号 12 に記載のアミノ酸配列のアミノ酸からなるポリペプチドの種相同体をコードする、ポリヌクレオチド;

(f) (a) ~ (e) のいずれか 1 つのポリヌクレオチドにストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド; または

(g) (a) ~ (e) のいずれか 1 つのポリヌクレオチドまたはその相補配列に対する同一性が少なくとも 70 % である塩基配列からなり、かつ、生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、からなる群より選択される、ポリヌクレオチド、を含む、項目 96 に記載の組成物。

【0108】

(98) 上記 R h o ポリペプチドをコードする核酸分子は、配列番号 11 の 1 位 ~ 579 位を含む、項目 96 に記載の組成物。

【0109】

(99) 上記神経は、脊髄損傷、脳血管障害または脳外傷を含む状態にある、項目 96 に記載の組成物。

【0110】

(100) 上記因子は、アンチセンス分子または RNA i を含む、項目 96 に記載の組成物。

【0111】

(101) 神経を再生するための組成物であって、R h o キナーゼポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子を含む、組成物。

【0112】

(102) 上記 R h o キナーゼポリペプチドは、

(a) 配列番号 18 に記載の核酸配列のヌクレオチドもしくはそのフラグメントによってコードされる、ポリペプチド;

(b) 配列番号 19 に記載のアミノ酸配列のアミノ酸もしくはそのフラグメントを有する、ポリペプチド;

(c) 配列番号 19 に記載のアミノ酸配列のアミノ酸において、1 以上のアミノ酸が、置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも 1 つの変異を有する改変体ポリペプチドであって、生物学的活性を有する、改変体ポリペプチド

(d) 配列番号 18 に記載の塩基配列のヌクレオチドのスプライス改変体もしくは対立遺伝子改変体によってコードされる、ポリペプチド;

(e) 配列番号 19 に記載のアミノ酸配列のアミノ酸を有するポリペプチドの、種相同体ポリペプチド; または

(f) (a) ~ (e) のいずれか 1 つのポリペプチドのアミノ酸配列に対する同一性が少なくとも 70 % であるアミノ酸配列からなり、かつ、生物学的活性を有する、ポリペプチド、

を含む、項目 101 に記載の組成物。

【0113】

(103) 上記 R h o キナーゼポリペプチドは、配列番号 19 のアミノ酸の 1 位 ~ 1388 位を含む、項目 101 に記載の組成物。

【0114】

(104) 上記神経は、脊髄損傷、脳血管障害または脳外傷を含む状態にある、項目



101に記載の組成物。

【0115】

(105) 上記因子は、抗体を含む、項目101に記載の組成物。

【0116】

(106) 神経を再生するための組成物であって、Rhoキナーゼポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子を含む、組成物。

【0117】

(107) 上記Rhoキナーゼポリペプチドをコードする核酸分子は、

(a) 配列番号18に記載の塩基配列のヌクレオチドまたはそのフラグメント配列を有する、ポリヌクレオチド；

(b) 配列番号19に記載のアミノ酸配列のアミノ酸またはそのフラグメントをコードする、ポリヌクレオチド、

(c) 配列番号19に記載のアミノ酸配列のアミノ酸において、1以上のアミノ酸が、置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも1つの変異を有する改変体ポリペプチドであって、生物学的活性を有する改変体ポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチド；

(d) 配列番号18に記載の塩基配列のヌクレオチドのスプライス変異体または対立遺伝子変異体である、ポリヌクレオチド；

(e) 配列番号19に記載のアミノ酸配列のアミノ酸からなるポリペプチドの種相同志をコードする、ポリヌクレオチド；

(f) (a)～(e)のいずれか1つのポリヌクレオチドにストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；または

(g) (a)～(e)のいずれか1つのポリヌクレオチドまたはその相補配列に対する同一性が少なくとも70%である塩基配列からなり、かつ、生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、からなる群より選択される、ポリヌクレオチド、を含む、項目106に記載の組成物。

【0118】

(108) 上記Rhoキナーゼは、配列番号18の1位～4164位を含む、項目106に記載の組成物。

【0119】

(109) 上記神経は、脊髄損傷、脳血管障害または脳外傷を含む状態にある、項目106に記載の組成物。

【0120】

(110) 上記因子は、アンチセンス分子またはRNAiを含む、項目106に記載の組成物。

【0121】

(111) 神経を再生するための組成物であって、p21ポリペプチドを含む、組成物。

【0122】

(112) 上記p21ポリペプチドは、

(a) 配列番号13または配列番号22に記載の核酸配列のヌクレオチドもしくはそのフラグメントによってコードされる、ポリペプチド；

(b) 配列番号14または配列番号23に記載のアミノ酸配列のアミノ酸もしくはそのフラグメントを有する、ポリペプチド；

(c) 配列番号14または配列番号23に記載のアミノ酸配列のアミノ酸において、1以上のアミノ酸が、置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも1つの変異を有する改変体ポリペプチドであって、生物学的活性を有する、改変体ポリペプチド

(d) 配列番号 13 または配列番号 22 に記載の塩基配列のヌクレオチドのサプライズ変異体もしくは対立遺伝子変異体によってコードされる、ポリペプチド;

(e) 配列番号 14 または配列番号 23 に記載のアミノ酸配列のアミノ酸を有するポリペプチドの、種相同体ポリペプチド; または

(f) (a) ~ (e) のいずれか 1 つのポリペプチドのアミノ酸配列に対する同一性が少なくとも 70% であるアミノ酸配列からなり、かつ、生物学的活性を有する、ポリペプチド、

を含む、項目 111 に記載の組成物。

【0123】

(113) 上記 p 21 ポリペプチドは、配列番号 14 または配列番号 23 のアミノ酸の 1 位 ~ 140 位を含む、項目 111 に記載の組成物。

【0124】

(114) 上記神経は、脊髄損傷、脳血管障害または脳外傷を含む状態にある、項目 111 に記載の組成物。

【0125】

(115) 上記 p 21 ポリペプチドは、さらに、PTD ドメインを含む、項目 111 に記載の組成物。

【0126】

(116) 上記 PTD ドメインは、YGRKKRRQRRR またはその 1 または数個の置換、付加および/もしくは欠失を含むアミノ酸配列を有する、項目 115 に記載の組成物。

【0127】

(117) 上記 PTD ドメインは、上記 p 21 ポリペプチドの C 末端側または N 末端側に配置される、項目 115 に記載の組成物。

【0128】

(118) 上記 p 21 ポリペプチドは、核移行ドメインを実質的に含まない、項目 111 に記載の組成物。

【0129】

(119) 上記 p 21 ポリペプチドは、さらに、PTD ドメインを含み、かつ、上記 p 21 ポリペプチドは、核移行ドメインを実質的に含まない、項目 111 に記載の組成物。

【0130】

(120) 上記 p 21 ポリペプチドは、さらに、PTD ドメインを含み、かつ、上記 p 21 ポリペプチドは、核移行ドメインを実質的に含まず、上記 PTD ドメインは上記 p 21 ポリペプチドの C 末端側に配置される、項目 111 に記載の組成物。

【0131】

(121) 神経を再生するための組成物であって、p 21 ポリペプチドをコードする核酸分子を含む、組成物。

【0132】

(122) 上記 p 21 ポリペプチドをコードする核酸分子は、

(a) 配列番号 13 または配列番号 22 に記載の塩基配列のヌクレオチドまたはそのフラグメント配列を有する、ポリヌクレオチド;

(b) 配列番号 14 または配列番号 23 に記載のアミノ酸配列のアミノ酸またはそのフラグメントをコードする、ポリヌクレオチド;

(c) 配列番号 14 または配列番号 23 に記載のアミノ酸配列のアミノ酸において、1 以上のアミノ酸が、置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも 1 つの変異を有する変異体ポリペプチドであって、生物学的活性を有する変異体ポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチド;

(d) 配列番号 13 または配列番号 22 に記載の塩基配列のヌクレオチドのサプライズ変異体または対立遺伝子変異体である、ポリヌクレオチド;

(e) 配列番号 14 または配列番号 23 に記載のアミノ酸配列のアミノ酸からなるポリペプチドの種相同体をコードする、ポリヌクレオチド;

(f) (a) ~ (e) のいずれか 1 つのポリヌクレオチドにストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド; または

(g) (a) ~ (e) のいずれか 1 つのポリヌクレオチドまたはその相補配列に対する同一性が少なくとも 70% である塩基配列からなり、かつ、生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、  
からなる群より選択される、ポリヌクレオチド、  
を含む、項目 121 に記載の組成物。

【0133】

(123) 上記 p21 ポリペプチドをコードする核酸分子は、配列番号 13 または配列番号 22 の塩基配列の 1 位 ~ 420 位を含む、項目 121 に記載の組成物。

【0134】

(124) 上記神経は、脊髄損傷、脳血管障害または脳外傷を含む状態にある、項目 121 に記載の組成物。

【0135】

(125) 上記 p21 ポリペプチドをコードする核酸分子は、さらに、PTD ドメインをコードする因子を含む、項目 121 に記載の組成物。

【0136】

(126) 上記 PTD ドメインは、YGRKKRRQRRR またはその 1 または数個の置換、付加および/もしくは欠失を含むアミノ酸配列を有する、項目 125 に記載の組成物。

【0137】

(127) 上記 PTD ドメインをコードする配列は、上記 p21 ポリペプチドをコードする配列の 5' 末端側または 3' 末端側に配置される、項目 125 に記載の組成物。

【0138】

(128) 上記 p21 ポリペプチドをコードする核酸分子は、核移行ドメインをコードする配列を実質的に含まない、項目 121 に記載の組成物。

【0139】

(129) 上記 p21 ポリペプチドをコードする核酸分子は、さらに、PTD ドメインをコードする配列を含み、かつ、上記 p21 ポリペプチドをコードする核酸分子は、核移行ドメインをコードする配列を実質的に含まない、項目 121 に記載の組成物。

【0140】

(130) 上記 p21 ポリペプチドをコードする核酸分子は、さらに、PTD ドメインをコードする配列を含み、かつ、上記 p21 ポリペプチドをコードする核酸分子は、核移行ドメインをコードする配列を実質的に含まず、上記 PTD ドメインをコードする配列は上記 p21 ポリペプチドをコードする核酸分子の 3' 末端側に配置される、項目 121 に記載の組成物。

【0141】

(131) PTD ドメインおよび神経再生因子を含む、神経を再生するための組成物。

【0142】

(132) 上記神経再生因子は、p75 シグナル伝達経路を阻害する、項目 131 に記載の組成物。

【0143】

(133) 上記神経再生因子は、p75 シグナル伝達経路における伝達因子もしくはその改変体もしくはフラグメント、または p75 シグナル伝達経路における伝達因子に対して特異的に相互作用する因子を含む、項目 131 に記載の組成物。

【0144】

(134) 上記 p75 シグナル伝達経路における伝達因子は、MAG、PKC、IP<sub>3</sub>、GTPb、p75、Rho GDI、Rho、p21 および Rho キナーゼからなる群より選択される少なくとも 1 つの伝達因子を含む、項目 133 に記載の組成物。

【0145】

(135) 上記神経再生因子は、MAG と GTPb との相互作用の阻害、PKC の阻害、IP<sub>3</sub> の活性化、GTPb と p75 との相互作用の阻害、p75 と Rho との相互作用の阻害、p75 と Rho GDI との相互作用の阻害、Rho と Rho GDI との相互作用の維持または強化、Rho GDP から Rho GTP への変換阻害、Rho と Rho キナーゼとの相互作用の阻害および Rho キナーゼの活性阻害からなる群より選択される少なくとも 1 つの作用を有する、項目 131 に記載の組成物。

【0146】

(136) 上記神経再生因子は、MAG と GTPb との相互作用を抑制または消失する因子、PKC の阻害因子、IP<sub>3</sub> の活性化因子、GTPb と p75 との相互作用を抑制または消失する因子、p75 と Rho GDI との相互作用を抑制または消失する因子、p75 と Rho との相互作用を抑制または消失する因子、Rho と Rho GDI との相互作用を維持または強化する因子、Rho GDP から Rho GTP への変換を阻害する因子、Rho と Rho キナーゼとの相互作用を阻害する因子、および Rho キナーゼの活性を阻害する因子からなる群より選択される少なくとも 1 つの因子を含む、項目 131 に記載の組成物。

【0147】

(137) 上記神経再生因子は、Pep5 ポリペプチド、Pep5 ポリペプチドをコードする核酸分子、PKC の阻害因子、IP<sub>3</sub> の活性化因子、p75 ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、p75 ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、p75 細胞外ドメインポリペプチド、p75 細胞外ドメインポリペプチドをコードする核酸分子、Rho GDI ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、Rho GDI ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、Rho GDI ポリペプチド、Rho GDI ポリペプチドをコードする核酸分子、MAG ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、MAG ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、p21 ポリペプチド、p21 をコードする核酸分子、Rho ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、Rho ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、Rho キナーゼに対して特異的に相互作用する因子および Rho キナーゼをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子ならびにその改変体およびフラグメントからなる群より選択される因子を含む、項目 131 に記載の組成物。

【0148】

(138) 上記 PTD ドメインは、YGRKKRRQRRR またはその 1 または数個の置換、付加および／もしくは欠失を含むアミノ酸配列を有する、項目 131 に記載の組成物。

【0149】

(139) 上記 PTD ドメインは、上記神経再生因子の C 末端側または N 末端側に配置される、項目 131 に記載の組成物。

【0150】

(140) 上記神経再生因子は、細胞質に留まり得る、項目 131 に記載の組成物。

【0151】

(141) PTD ドメインをコードする核酸配列および神経再生因子をコードする核酸配列を含む核酸分子を含む、神経を再生するための組成物。

【0152】

(142) 上記神経再生因子は、p75 シグナル伝達経路を阻害する、項目 141 に記載の組成物。

【0153】

(143) 上記神経再生因子は、p75シグナル伝達経路における伝達因子もしくはその改変体もしくはフラグメント、またはp75シグナル伝達経路における伝達因子に対して特異的に相互作用する因子を含む、項目141に記載の組成物。

【0154】

(144) 上記p75シグナル伝達経路における伝達因子は、MAG、PKC、IP<sub>3</sub>、GTPb、p75、Rho GDI、Rho、p21およびRhoキナーゼからなる群より選択される少なくとも1つの伝達因子を含む、項目143に記載の組成物。

【0155】

(145) 上記神経再生因子は、MAGとGTPbとの相互作用の阻害、PKCの阻害、IP<sub>3</sub>の活性化、GTPbとp75との相互作用の阻害、p75とRhoとの相互作用の阻害、p75とRho GDIとの相互作用の阻害、RhoとRho GDIとの相互作用の維持または強化、RhoGDPからRhoGTPへの変換阻害、RhoとRhoキナーゼとの相互作用の阻害およびRhoキナーゼの活性阻害からなる群より選択される少なくとも1つの作用を有する、項目141に記載の組成物。

【0156】

(146) 上記神経再生因子は、MAGとGTPbとの相互作用を抑制または消失する因子、PKCの阻害因子、IP<sub>3</sub>の活性化因子、GTPbとp75との相互作用を抑制または消失する因子、p75とRho GDIとの相互作用を抑制または消失する因子、p75とRhoとの相互作用を抑制または消失する因子、RhoとRho GDIとの相互作用を維持または強化する因子、RhoGDPからRhoGTPへの変換を阻害する因子、RhoとRhoキナーゼとの相互作用を阻害する因子、およびRhoキナーゼの活性を阻害する因子からなる群より選択される少なくとも1つの因子を含む、項目141に記載の組成物。

・【0157】

(147) 上記神経再生因子は、Pep5ポリペプチド、PKCの阻害因子、IP<sub>3</sub>の活性化因子、p75ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、p75ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、p75細胞外ドメインポリペプチド、Rho GDIポリペプチド、MAGポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、MAGポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、p21ポリペプチド、Rhoポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、Rhoポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、Rhoキナーゼに対して特異的に相互作用する因子およびRhoキナーゼをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子ならびにその改変体およびフラグメントからなる群より選択される因子を含む、項目141に記載の組成物。

【0158】

(148) 上記PTDドメインは、YGRKKRRQRRRまたはその1または数個の置換、付加および／もしくは欠失を含むアミノ酸配列を有する、項目141に記載の組成物。

【0159】

(149) 上記PTDドメインをコードする配列は、上記神経再生因子の5'末端側または3'末端側に配置される、項目141に記載の組成物。

【0160】

(150) 上記神経再生因子は、細胞質中に留まり得る、項目141に記載の組成物。

【0161】

(151) 神経突起伸展の阻害を破壊または減少する方法であって、p75シグナル伝達経路を阻害する工程を含む、方法。

【0162】

(152) 上記p75シグナル伝達経路の阻害は、p75シグナル伝達経路における伝達因子もしくはその改変体もしくはフラグメント、またはp75シグナル伝達経路にお

ける伝達因子に対して特異的に相互作用する因子を再生に有効な量で提供することによる、項目151に記載の方法。

【0163】

(153) 上記p75シグナル伝達経路における伝達因子は、MAG、PKC、IP<sub>3</sub>、G1b、p75、Rho GDI、Rho、p21およびRhoキナーゼからなる群より選択される少なくとも1つの伝達因子を含む、項目151に記載の方法。

【0164】

(154) 上記p75シグナル伝達経路の阻害は、MAGとG1bとの相互作用の阻害、PKCの阻害、IP<sub>3</sub>の活性化、G1bとp75との相互作用の阻害、p75とRhoとの相互作用の阻害、p75とRho GDIとの相互作用の阻害、RhoとRho GDIとの相互作用の維持または強化、RhoGDPからRhoGTPへの変換阻害、RhoとRhoキナーゼとの相互作用の阻害およびRhoキナーゼの活性阻害からなる群より選択される、項目151に記載の方法。

【0165】

(155) 上記p75シグナル伝達経路の阻害は、MAGとG1bとの相互作用を抑制または消失する因子、PKCの阻害因子、IP<sub>3</sub>の活性化因子、G1bとp75との相互作用を抑制または消失する因子、p75とRho GDIとの相互作用を抑制または消失する因子、p75とRhoとの相互作用を抑制または消失する因子、RhoとRho GDIとの相互作用を維持または強化する因子、RhoGDPからRhoGTPへの変換を阻害する因子、RhoとRhoキナーゼとの相互作用を阻害する因子、およびRhoキナーゼの活性を阻害する因子からなる群より選択される少なくとも1つの因子を再生に有効な量で提供することによる、項目151に記載の方法。

【0166】

(156) 上記p75シグナル伝達経路を阻害する工程は、再生に有効な量の、Pep5ポリペプチド、Pep5ポリペプチドをコードする核酸分子、PKCの阻害因子、IP<sub>3</sub>の活性化因子、p75ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、p75ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、p75細胞外ドメインポリペプチド、p75細胞外ドメインポリペプチドをコードする核酸分子、Rho GDIポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、Rho GDIポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、Rho GDIポリペプチド、Rho GDIポリペプチドをコードする核酸分子、MAGポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、MAGポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、p21ポリペプチド、p21をコードする核酸分子、Rhoポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、Rhoポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、Rhoキナーゼに対して特異的に相互作用する因子およびRhoキナーゼをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子ならびにその改変体およびフラグメントからなる群より選択される少なくとも1つの分子を含む組成物を上記神経に与える工程、

を包含する、項目151に記載の方法。

【0167】

(157) 上記因子は、PTDドメインに結合する、項目153に記載の方法。

【0168】

(158) p75シグナル伝達経路を阻害する因子を含む、神経突起伸展の阻害を破壊または減少する組成物。

【0169】

(159) 上記p75シグナル伝達経路を阻害する因子は、神経再生が所望される部位における神経細胞に送達されるのに適切な形態である、項目158に記載の組成物。

【0170】

(160) 上記p75シグナル伝達経路を阻害する因子は、p75シグナル伝達経路における伝達因子もしくはその改変体もしくはフラグメント、またはp75シグナル伝達

経路における伝達因子に対して特異的に相互作用する因子を含む、項目158に記載の組成物。

【0171】

(161) 上記p75シグナル伝達経路における伝達因子は、MAG、PKC、IP<sub>3</sub>、GTPb、p75、Rho GDI、Rho、p21およびRhoキナーゼからなる群より選択される少なくとも1つの伝達因子を含む、項目160に記載の組成物。

【0172】

(162) 上記p75シグナル伝達経路を阻害する因子は、MAGとGTPbとの相互作用の阻害、PKCの阻害、IP<sub>3</sub>の活性化、GTPbとp75との相互作用の阻害、p75とRhoとの相互作用の阻害、p75とRho GDIとの相互作用の阻害、RhoとRho GDIとの相互作用の維持または強化、RhoGDPからRhoGTPへの変換阻害、RhoとRhoキナーゼとの相互作用の阻害およびRhoキナーゼの活性阻害からなる群より選択される少なくとも1つの作用を有する、項目158に記載の組成物。

【0173】

(163) 上記p75シグナル伝達経路を阻害する因子は、MAGとGTPbとの相互作用を抑制または消失する因子、PKCの阻害因子、IP<sub>3</sub>の活性化因子、GTPbとp75との相互作用を抑制または消失する因子、p75とRho GDIとの相互作用を抑制または消失する因子、p75とRhoとの相互作用を抑制または消失する因子、RhoとRho GDIとの相互作用を維持または強化する因子、RhoGDPからRhoGTPへの変換を阻害する因子、RhoとRhoキナーゼとの相互作用を阻害する因子、およびRhoキナーゼの活性を阻害する因子からなる群より選択される少なくとも1つの因子を含み、上記p75シグナル伝達経路を阻害する因子は、再生に有効な量で存在する、項目158に記載の組成物。

【0174】

(164) 上記p75シグナル伝達経路を阻害する因子は、Pep5ポリペプチド、Pep5ポリペプチドをコードする核酸分子、PKCの阻害因子、IP<sub>3</sub>の活性化因子、p75ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、p75ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、p75細胞外ドメインポリペプチド、p75細胞外ドメインポリペプチドをコードする核酸分子、Rho GDIポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、Rho GDIポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、Rho GDIポリペプチド、Rho GDIポリペプチドをコードする核酸分子、MAGポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、MAGポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、p21ポリペプチド、p21をコードする核酸分子、Rhoポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、Rhoポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、Rhoキナーゼに対して特異的に相互作用する因子およびRhoキナーゼをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子ならびにその改変体およびフラグメントからなる群より選択される少なくとも1つの分子を含む、項目158に記載の組成物。

【0175】

(165) 上記因子は、PTDドメインに結合する、項目158に記載の組成物。

【0176】

(166) 神経細胞のネットワークの構築のための方法であって、上記神経細胞におけるp75シグナル伝達経路を阻害する工程を含む、方法。

【0177】

(167) 上記p75シグナル伝達経路の阻害は、p75シグナル伝達経路における伝達因子もしくはその改変体もしくはフラグメント、またはp75シグナル伝達経路における伝達因子に対して特異的に相互作用する因子を再生に有効な量で上記神経細胞に提供することによる、項目166に記載の方法。

【0178】

(168) 上記p75シグナル伝達経路における伝達因子は、MAG、PKC、IP

3、GT1b、p75、Rho GDI、Rho、p21およびRhoキナーゼからなる群より選択される少なくとも1つの伝達因子を含む、項目166に記載の方法。

【0179】

(169) 上記p75シグナル伝達経路の阻害は、MAGとGT1bとの相互作用の阻害、PKCの阻害、IP<sub>3</sub>の活性化、GT1bとp75との相互作用の阻害、p75とRhoとの相互作用の阻害、p75とRho GDIとの相互作用の阻害、RhoとRho GDIとの相互作用の維持または強化、RhoGDPからRhoGTPへの変換阻害、RhoとRhoキナーゼとの相互作用の阻害およびRhoキナーゼの活性阻害からなる群より選択される、項目166に記載の方法。

【0180】

(170) 上記p75シグナル伝達経路の阻害は、MAGとGT1bとの相互作用を抑制または消失する因子、PKCの阻害因子、IP<sub>3</sub>の活性化因子、GT1bとp75との相互作用を抑制または消失する因子、p75とRho GDIとの相互作用を抑制または消失する因子、p75とRhoとの相互作用を抑制または消失する因子、RhoとRho GDIとの相互作用を維持または強化する因子、RhoGDPからRhoGTPへの変換を阻害する因子、RhoとRhoキナーゼとの相互作用を阻害する因子、およびRhoキナーゼの活性を阻害する因子からなる群より選択される少なくとも1つの因子を再生に有効な量で提供することによる、項目166に記載の方法。

【0181】

(171) 上記p75シグナル伝達経路を阻害する工程は、再生に有効な量の、Pep5ポリペプチド、Pep5ポリペプチドをコードする核酸分子、PKCの阻害因子、IP<sub>3</sub>の活性化因子、p75ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、p75ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、p75細胞外ドメインポリペプチド、p75細胞外ドメインポリペプチドをコードする核酸分子、Rho GDIポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、Rho GDIポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、Rho GDIポリペプチド、Rho GDIポリペプチドをコードする核酸分子、MAGポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、MAGポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、p21ポリペプチド、p21をコードする核酸分子、Rhoポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、Rhoポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、Rhoキナーゼに対して特異的に相互作用する因子およびRhoキナーゼをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子ならびにその改変体およびフラグメントからなる群より選択される少なくとも1つの分子を含む組成物を上記神経に与える工程、

を包含する、項目166に記載の方法。

【0182】

(172) 上記因子は、PTDドメインに結合する、項目167に記載の方法。

【0183】

(173) p75シグナル伝達経路を阻害する因子を含む、神経細胞のネットワークの構築のための組成物。

【0184】

(174) 上記p75シグナル伝達経路を阻害する因子は、p75シグナル伝達経路における伝達因子もしくはその改変体もしくはフラグメント、またはp75シグナル伝達経路における伝達因子に対して特異的に相互作用する因子を含む、項目173に記載の組成物。

【0185】

(175) 上記p75シグナル伝達経路における伝達因子は、MAG、PKC、IP<sub>3</sub>、GT1b、p75、Rho GDI、Rho、p21およびRhoキナーゼからなる群より選択される少なくとも1つの伝達因子を含む、項目174に記載の組成物。

【0186】



(176) 上記p75シグナル伝達経路を阻害する因子は、MAGとG T 1 bとの相互作用の阻害、P K Cの阻害、I P<sub>3</sub>の活性化、G T 1 bとp75との相互作用の阻害、p75とR h oとの相互作用の阻害、p75とR h o G D Iとの相互作用の阻害、R h oとR h o G D Iとの相互作用の維持または強化、R h o G D PからR h o G T Pへの変換阻害、R h oとR h oキナーゼとの相互作用の阻害およびR h oキナーゼの活性阻害からなる群より選択される少なくとも1つの作用を有する、項目173に記載の組成物。

【0187】

(177) 上記p75シグナル伝達経路を阻害する因子は、MAGとG T 1 bとの相互作用を抑制または消失する因子、P K Cの阻害因子、I P<sub>3</sub>の活性化因子、G T 1 bとp75との相互作用を抑制または消失する因子、p75とR h o G D Iとの相互作用を抑制または消失する因子、p75とR h oとの相互作用を抑制または消失する因子、R h oとR h o G D Iとの相互作用を維持または強化する因子、R h o G D PからR h o G T Pへの変換を阻害する因子、R h oとR h oキナーゼとの相互作用を阻害する因子、およびR h oキナーゼの活性を阻害する因子からなる群より選択される少なくとも1つの因子を含み、上記p75シグナル伝達経路を阻害する因子は、再生に有効な量で存在する、項目173に記載の組成物。

【0188】

(178) 上記p75シグナル伝達経路を阻害する因子は、P e p 5ポリペプチド、P e p 5ポリペプチドをコードする核酸分子、P K Cの阻害因子、I P<sub>3</sub>の活性化因子、p75ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、p75ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、p75細胞外ドメインポリペプチド、p75細胞外ドメインポリペプチドをコードする核酸分子、R h o G D Iポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、R h o G D Iポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、R h o G D Iポリペプチド、R h o G D Iポリペプチドをコードする核酸分子、MAGポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、MAGポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、p21ポリペプチド、p21をコードする核酸分子、R h oポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、R h oポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、R h oキナーゼに対して特異的に相互作用する因子およびR h oキナーゼをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子ならびにその改変体およびフラグメントからなる群より選択される少なくとも1つの分子を含む、項目173に記載の組成物。

【0189】

(179) 上記因子は、P T Dドメインに結合する、項目174に記載の組成物。

【0190】

(180) 神経学的疾患を処置するためのキットであって、

(A) p75シグナル伝達経路を阻害する因子を含む組成物によって再生された細胞集団；

(B) 上記細胞集団を保存するための容器を包含する、キット。

【0191】

(181) 上記p75シグナル伝達経路を阻害する因子は、p75シグナル伝達経路における伝達因子もしくはその改変体もしくはフラグメント、またはp75シグナル伝達経路における伝達因子に対して特異的に相互作用する因子を含む、項目180に記載のキット。

【0192】

(182) 上記p75シグナル伝達経路における伝達因子は、MAG、P K C、I P<sub>3</sub>、G T 1 b、p75、R h o G D I、R h o、p21およびR h oキナーゼからなる群より選択される少なくとも1つの伝達因子を含む、項目181に記載のキット。

【0193】

(183) 上記p75シグナル伝達経路を阻害する因子は、MAGとG T 1 bとの相

相互作用の阻害、PKCの阻害、IP<sub>3</sub>の活性化、G<sub>T</sub>1bとp75との相互作用の阻害、p75とRhoとの相互作用の阻害、p75とRho GDIとの相互作用の阻害、RhoとRho GDIとの相互作用の維持または強化、RhoGDPからRhoGTPへの変換阻害、RhoとRhoキナーゼとの相互作用の阻害およびRhoキナーゼの活性阻害からなる群より選択される少なくとも1つの作用を有する、項目180に記載のキット。

【0194】

(184) 上記p75シグナル伝達経路を阻害する因子は、MAGとG<sub>T</sub>1bとの相互作用を抑制または消失する因子、PKCの阻害因子、IP<sub>3</sub>の活性化因子、G<sub>T</sub>1bとp75との相互作用を抑制または消失する因子、p75とRho GDIとの相互作用を抑制または消失する因子、p75とRhoとの相互作用を抑制または消失する因子、RhoとRho GDIとの相互作用を維持または強化する因子、RhoGDPからRhoGTPへの変換を阻害する因子、RhoとRhoキナーゼとの相互作用を阻害する因子、およびRhoキナーゼの活性を阻害する因子からなる群より選択される少なくとも1つの因子を含み、上記p75シグナル伝達経路を阻害する因子は、再生に有効な量で存在する、項目180に記載のキット。

【0195】

(185) 上記p75シグナル伝達経路を阻害する因子は、Pe<sub>p</sub>5ポリペプチド、Pe<sub>p</sub>5ポリペプチドをコードする核酸分子、PKCの阻害因子、IP<sub>3</sub>の活性化因子、p75ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、p75ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、p75細胞外ドメインポリペプチド、p75細胞外ドメインポリペプチドをコードする核酸分子、Rho GDIポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、Rho GDIポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、Rho GDIポリペプチドをコードする核酸分子、MAGポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、MAGポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、p21ポリペプチド、p21をコードする核酸分子、Rhoポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、Rhoポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、Rhoキナーゼに対して特異的に相互作用する因子およびRhoキナーゼをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子ならびにその改変体およびフラグメントからなる群より選択される少なくとも1つの分子を含む、項目180に記載のキット。

【0196】

(186) 上記因子は、PTDドメインに結合する、項目181に記載のキット。

【0197】

(187) 神経学的疾患を処置するための方法であって、上記方法は、以下：

(a) p75シグナル伝達経路を阻害する因子を含む組成物によって再生された細胞集団を提供する工程；および

(b) 上記細胞集団を上記患者に移植する工程、  
を包含する、方法。

【0198】

(188) 上記p75シグナル伝達経路の阻害は、p75シグナル伝達経路における伝達因子もしくはその改変体もしくはフラグメント、またはp75シグナル伝達経路における伝達因子に対して特異的に相互作用する因子を再生に有効な量で上記神経細胞に提供することによる、項目187に記載の方法。

【0199】

(189) 上記p75シグナル伝達経路における伝達因子は、MAG、PKC、IP<sub>3</sub>、G<sub>T</sub>1b、p75、Rho GDI、Rho、p21およびRhoキナーゼからなる群より選択される少なくとも1つの伝達因子を含む、項目188に記載の方法。

【0200】

(190) 上記p75シグナル伝達経路の阻害は、MAGとG<sub>T</sub>1bとの相互作用の阻害、PKCの阻害、IP<sub>3</sub>の活性化、G<sub>T</sub>1bとp75との相互作用の阻害、p75と

R h oとの相互作用の阻害、p 7 5とR h o G D Iとの相互作用の阻害、R h oとR h o G D Iとの相互作用の維持または強化、R h o G D PからR h o G T Pへの変換阻害、R h oとR h oキナーゼとの相互作用の阻害およびR h oキナーゼの活性阻害からなる群より選択される、項目187に記載の方法。

【0201】

(191) 上記p 7 5シグナル伝達経路の阻害は、M A GとG T 1 bとの相互作用を抑制または消失する因子、P K Cの阻害因子、I P 3の活性化因子、G T 1 bとp 7 5との相互作用を抑制または消失する因子、p 7 5とR h o G D Iとの相互作用を抑制または消失する因子、p 7 5とR h oとの相互作用を抑制または消失する因子、R h oとR h o G D Iとの相互作用を維持または強化する因子、R h o G D PからR h o G T Pへの変換を阻害する因子、R h oとR h oキナーゼとの相互作用を阻害する因子、およびR h oキナーゼの活性を阻害する因子からなる群より選択される少なくとも1つの因子を再生に有効な量で提供することによる、項目187に記載の方法。

【0202】

(192) 上記p 7 5シグナル伝達経路を阻害する工程は、再生に有効な量の、P e p 5ポリペプチド、P e p 5ポリペプチドをコードする核酸分子、P K Cの阻害因子、I P 3の活性化因子、p 7 5ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、p 7 5ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、p 7 5細胞外ドメインポリペプチド、p 7 5細胞外ドメインポリペプチドをコードする核酸分子、R h o G D Iポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、R h o G D Iポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、R h o G D Iポリペプチド、R h o G D Iポリペプチドをコードする核酸分子、M A Gポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、M A Gポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、p 2 1ポリペプチド、p 2 1をコードする核酸分子、R h oポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、R h oポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、R h oキナーゼに対して特異的に相互作用する因子およびR h oキナーゼをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子ならびにその改変体およびフラグメントからなる群より選択される少なくとも1つの分子を含む組成物を上記神経に与える工程、を包含する、項目187に記載の方法。

【0203】

(193) 上記因子は、P T Dドメインに結合する、項目188に記載の方法。

【0204】

(194) 神経再生を誘導する因子を同定するためのスクリーニング方法であって、上記方法は、以下：

(a) p 7 5シグナル伝達経路において相互作用する少なくとも2つの因子を、試験因子の存在下で接触させる工程、および

(b) 上記少なくとも2つの相互作用する因子の間の相互作用レベルを、上記試験因子の非存在下における相互作用レベルと比較する工程、を包含し、

ここで、上記試験因子の非存在下と比較して、試験因子の存在下において相互作用が減少した場合、上記試験因子は、神経を再生するための因子として同定される、方法。

【0205】

(195) 上記相互作用は、M A GとG T 1 bとの相互作用、G T 1 bとp 7 5との相互作用、p 7 5とR h oとの相互作用、p 7 5とR h o G D Iとの相互作用、R h oとR h o G D Iとの相互作用、R h o G D PからR h o G T Pへの変換、R h oとR h oキナーゼとの相互作用およびR h oキナーゼの活性からなる群より選択される少なくとも1つの相互作用を含み、

上記相互作用の減少は、M A GとG T 1 bとの相互作用の阻害、G T 1 bとp 7 5との相互作用の阻害、p 7 5とR h oとの相互作用の阻害、p 7 5とR h o G D Iとの相互

作用の阻害、RhoとRho GDIとの相互作用の維持または強化、Rho GDPからRho GTPへの変換阻害、RhoとRhoキナーゼとの相互作用の阻害およびRhoキナーゼの活性阻害からなる群より選択される少なくとも1つの作用を含む、項目194に記載の方法。

【0206】

(196) 上記少なくとも2つの因子は、配列番号4または17に少なくとも70%相同性であるアミノ酸配列を有する第1のポリペプチドまたはそのフラグメントおよび配列番号6に少なくとも70%相同性であるアミノ酸配列を有する第2のポリペプチドまたはそのフラグメントを含み、

上記比較工程(b)は、上記第1のポリペプチドと上記第2のポリペプチドとの間の結合レベルを、上記試験因子の非存在下における結合レベルと比較することを含む、項目194に記載の方法。

【0207】

(197) 項目194に記載の方法によって同定される、調節因子。

【0208】

(198) 項目197に記載の調節因子を含む、薬学的組成物。

【0209】

(199) 神経学的疾患、障害または状態を、予防または処置する方法であって、上記方法は、項目198に記載の薬学的組成物を被験体に投与する工程を包含する、方法。

【0210】

(200) MAGポリペプチドをコードする核酸分子、p75ポリペプチドをコードする核酸分子、Rho GDIポリペプチドをコードする核酸分子、Rhoをコードする核酸分子、p21をコードする核酸分子およびRhoキナーゼをコードする核酸分子からなる群より選択される少なくとも1つの核酸分子の配列において野生型とは異なる配列が導入された配列を有する核酸分子を含む、ベクター。

【0211】

(201) 項目200に記載のベクターを含む、細胞。

【0212】

(202) 項目200に記載のベクターを含む、組織。

【0213】

(203) 項目200に記載のベクターを含む、臓器。

【0214】

(204) 項目200に記載のベクターを含む、生物。

【0215】

(205) 項目200に記載のベクターで形質転換された、神経改変トランスジェニック動物。

【0216】

(206) MAGポリペプチドをコードする核酸分子、p75ポリペプチドをコードする核酸分子、Rho GDIポリペプチドをコードする核酸分子、Rhoをコードする核酸分子、p21をコードする核酸分子およびRhoキナーゼをコードする核酸分子からなる群より選択される少なくとも1つの核酸分子が欠失された、神経改変ノックアウト動物。

【0217】

(207) 神経の再生を調節する方法であって、p75シグナル伝達経路を調節する工程を含む、方法。

【0218】

(208) さらに、PKCおよびIP<sub>3</sub>からなる群より選択される少なくとも1つの因子を調節する工程を包含する、項目207に記載の方法。

【0219】

(209) PKCおよびIP<sub>3</sub>の両方の因子を調節する因子をさらに包含する、項目

207に記載の方法。

【0220】

(210) PKCを阻害する工程を包含する、項目207に記載の方法。

【0221】

(211) IP<sub>3</sub>を活性化する工程を包含する、項目207に記載の方法。

【0222】

(212) 上記p75シグナル伝達経路の調節は、MAG、PKC、IP<sub>3</sub>、GTPb、p75、Rho GDI、Rho、p21およびRhoキナーゼからなる群より選択される少なくとも1つの伝達因子の調節を含む、項目207に記載の方法。

【0223】

(213) 上記p75シグナル伝達経路の調節は、RhoAの調節を含む、項目207に記載の方法。

【0224】

(214) 上記p75シグナル伝達経路の調節は、RhoAの活性化およびPKCの阻害を含み、上記再生の調節は再生の活性化である、項目207に記載の方法。

【0225】

(215) さらにIP<sub>3</sub>を活性化することを包含する、項目214に記載の方法。

【0226】

(216) 上記PKCの調節因子は、MAG、Nogoおよびp75からなる群より選択される、項目207に記載の方法。

【0227】

(217) 上記IP<sub>3</sub>の調節因子は、MAG、Nogoおよびp75からなる群より選択される、項目207に記載の方法。

【0228】

(218) 上記神経の再生は、インビボまたはインビトロで行われる、項目207に記載の方法。

【0229】

(219) 上記神経は、脊髄損傷、脳血管障害または脳外傷を含む状態にある、項目207に記載の方法。

【0230】

(220) 上記因子は、PTDドメインに結合する、項目208に記載の方法。

【0231】

(221) 神経障害および／または神経の状態を、処置、予防、診断または予後する方法であって、上記処置、予防、診断または予後を必要とするかまたはそのことが予想される被検体において、p75シグナル伝達経路を調節する工程を含む、方法。

【0232】

(222) さらに、PKCおよびIP<sub>3</sub>からなる群より選択される少なくとも1つの因子を調節する工程を包含する、項目221に記載の方法。

【0233】

(223) PKCおよびIP<sub>3</sub>の両方の因子を調節する因子をさらに包含する、項目221に記載の方法。

【0234】

(224) PKCを阻害する工程をさらに包含する、項目221に記載の方法。

【0235】

(225) IP<sub>3</sub>を活性化する工程をさらに包含する、項目221に記載の方法。

【0236】

(226) 上記p75シグナル伝達経路の調節は、MAG、PKC、IP<sub>3</sub>、GTPb、p75、Rho GDI、Rho、p21およびRhoキナーゼからなる群より選択される少なくとも1つの伝達因子の調節を含む、項目221に記載の方法。

【0237】

(227) 上記 p 75 シグナル伝達経路の調節は、R h o A の調節を含む、項目 221 に記載の方法。

【0238】

(228) 上記 p 75 シグナル伝達経路の調節は、R h o A の活性化および P K C の阻害を含み、上記再生の調節は再生の活性化である、項目 221 に記載の方法。

【0239】

(229) さらに I P<sub>3</sub> を活性化することを包含する、項目 228 に記載の方法。

【0240】

(230) 上記 P K C の調節因子は、M A G、N o g o および p 75 からなる群より選択される、項目 221 に記載の方法。

【0241】

(231) 上記 I P<sub>3</sub> の調節因子は、M A G、N o g o および p 75 からなる群より選択される、項目 221 に記載の方法。

【0242】

(232) 上記神経の再生は、インビボまたはインビトロで行われる、項目 221 に記載の方法。

【0243】

(233) 上記神経は、脊髄損傷、脳血管障害または脳外傷を含む状態にある、項目 221 に記載の方法。

【0244】

(234) 上記因子は、P T D ドメインに結合する、項目 222 に記載の方法。

【0245】

(235) 神経の再生を調節するための組成物であって、p 75 シグナル伝達経路を調節する因子を含む、組成物。

【0246】

(236) さらに、P K C を調節する因子および I P<sub>3</sub> を調節する因子からなる群より選択される少なくとも 1 つの因子を含む、項目 235 に記載の組成物。

【0247】

(237) P K C を調節する因子および I P<sub>3</sub> を調節する因子の両方をさらに含む、項目 235 に記載の組成物。

【0248】

(238) P K C を阻害する因子をさらに含む、項目 235 に記載の組成物。

【0249】

(239) I P<sub>3</sub> を活性化する因子をさらに含む、項目 235 に記載の組成物。

【0250】

(240) 上記 p 75 シグナル伝達経路を調節する因子は、M A G、P K C、I P<sub>3</sub>、G T 1 b、p 75、R h o G D I、R h o、p 21 および R h o キナーゼからなる群より選択される少なくとも 1 つの伝達因子の調節因子を含む、項目 235 に記載の組成物。

【0251】

(241) 上記 p 75 シグナル伝達経路を調節する因子は、R h o A の調節因子を含む、項目 235 に記載の組成物。

【0252】

(242) 上記 p 75 シグナル伝達経路を調節する因子は、R h o A の活性化因子および P K C の阻害因子を含み、上記再生の調節は再生の活性化である、項目 235 に記載の組成物。

【0253】

(243) さらに I P<sub>3</sub> の活性化因子を含む、項目 242 に記載の組成物。

【0254】

(244) 上記 P K C の調節因子は、M A G、N o g o および p 75 からなる群より

選択される、項目 235 に記載の組成物。

【0255】

(245) 上記  $IP_3$  の調節因子は、MAG、Nogoo および p75 からなる群より選択される、項目 235 に記載の組成物。

【0256】

(246) 上記神経の再生は、インビボまたはインビトロで行われる、項目 235 に記載の組成物。

【0257】

(247) 上記神経は、脊髄損傷、脳血管障害または脳外傷を含む状態にある、項目 235 に記載の組成物。

【0258】

(248) 上記因子は、PTD ドメインに結合する、項目 236 に記載の組成物。

【0259】

(249) 神経疾患、神経障害および／または神経の状態を、処置、予防、診断または予後するための組成物であって、p75 シグナル伝達経路を調節する因子を含む、組成物。

【0260】

(250) さらに、PKC を調節する因子および  $IP_3$  を調節する因子からなる群より選択される少なくとも 1 つの因子を含む、項目 249 に記載の組成物。

【0261】

(251) PKC を調節する因子および  $IP_3$  を調節する因子の両方をさらに含む、項目 235 に記載の組成物。

【0262】

(252) PKC を阻害する因子をさらに含む、項目 249 に記載の組成物。

【0263】

(253)  $IP_3$  を活性化する因子をさらに含む、項目 249 に記載の組成物。

【0264】

(254) 上記 p75 シグナル伝達経路を調節する因子は、MAG、PKC、 $IP_3$ 、GT1b、p75、Rho GDI、Rho、p21 および Rho キナーゼからなる群より選択される少なくとも 1 つの伝達因子の調節因子を含む、項目 235 に記載の組成物。

【0265】

(255) 上記 p75 シグナル伝達経路を調節する因子は、RhoA の調節因子を含む、項目 249 に記載の組成物。

【0266】

(256) 上記 p75 シグナル伝達経路を調節する因子は、RhoA の活性化因子および PKC の阻害因子を含み、上記再生の調節は再生の活性化である、項目 249 に記載の組成物。

【0267】

(257) さらに  $IP_3$  の活性化因子を含む、項目 256 に記載の組成物。

【0268】

(258) 上記 PKC の調節因子は、MAG、Nogoo および p75 からなる群より選択される、項目 249 に記載の組成物。

【0269】

(259) 上記  $IP_3$  の調節因子は、MAG、Nogoo および p75 からなる群より選択される、項目 249 に記載の組成物。

【0270】

(260) 上記神経の再生は、インビボまたはインビトロで行われる、項目 249 に記載の組成物。

【0271】

(261) 上記神経は、脊髄損傷、脳血管障害または脳外傷を含む状態にある、項目 249 に記載の組成物。

【0272】

(262) 上記因子は、PTDドメインに結合する、項目 250 に記載の組成物。

【0273】

以下に、本発明の好ましい実施形態を示すが、当業者は本発明の説明および当該分野における周知慣用技術からその実施形態などを適宜実施することができ、本発明が奏する作用および効果を容易に理解することが認識されるべきである。

【発明の効果】

【0274】

神経突起伸展の阻害に関連する p75 とその相互作用因子との関係を明らかにすることによって、神経の再生およびその神経の再生に基づいて神経学的疾患を処置するための薬学的組成物および方法が提供される。

【発明を実施するための最良の形態】

【0275】

以下、本発明を説明する。本明細書の全体にわたり、単数形の表現は、特に言及しない限り、その複数形の概念をも含むことが理解されるべきである。従って、単数形の冠詞または形容詞（例えば、英語の場合は「a」、「an」、「the」など）は、特に言及しない限り、その複数形の概念をも含むことが理解されるべきである。また、本明細書において使用される用語は、特に言及しない限り、当該分野で通常用いられる意味で用いられることが理解されるべきである。したがって、他に定義されない限り、本明細書中で使用される全ての専門用語および科学技術用語は、本発明の属する分野の当業者によって一般的に理解されるのと同じ意味を有する。矛盾する場合、本明細書（定義を含めて）が優先する。

【0276】

(定義)

本明細書において「p75 シグナル伝達経路」とは、ミエリン由来タンパク質が神経膜の p75 レセプターを介して Rho を活性化し、神経突起の伸展を阻害するにいたる一連のシグナル伝達経路をいう。従来、中枢神経の軸索がいったん損傷をうけたらもはや再生しない現象をもたらすメカニズムであると思われていた。p75 シグナル伝達経路は、図 22 を参照して説明すると、ミエリン由来タンパク質が p75 に作用すると、p75 を介して Rho が活性化され、神経の突起伸展を阻害する経路である。しかし、本発明により、この経路を調節することによって神経再生を調節することができるとが判明した。

【0277】

本明細書において「Pep5」とは、p75 の細胞内ドメインに結合することにより、p75 による Rho の活性化を阻害するペプチドをいう。Pep5 は、代表的に、配列番号 1（縮重核酸配列）および配列番号 2（アミノ酸配列）に示す配列を有し、その改変体およびフラグメントもまた、生物学的活性を有する限り、Pep5 の定義内に含まれる。Pep5 の生物学的活性としては、例えば、ミエリン由来タンパク質による神経突起伸展阻害のブロックが挙げられるがそれらに限定されず、そのような活性は、ミエリン由来タンパク質の Rho 活性化のブロックのような Rho の活性アッセイで測定することができる。

【0278】

本明細書において「p75」は、p75<sup>NTR</sup> と本明細書において互換可能に用いられ、ニューロトロフィンをリガンドとし、また、ミエリン由来タンパク質のシグナル伝達を介する、一回膜貫通型レセプターをいう（原則として、p75 に統一しました）。p75 は、ニューロトロフィンレセプターであり、ニューロトロフィンならびにいくつかのミエリン成分（ミエリン結合糖タンパク質、Nogo および稀突起神経膠細胞ミエリン糖タンパク質を含む）による軸索伸長の調節に関与する。ニューロトロフィンレセプター（p75）は、驚くべきほど多様な生物学的効果（例えば、細胞死、シュヴァン細胞移動、シナ



プス伝達の調節、ならびに感覚ニューロンおよびカルシウム流動の機能的調節が挙げられる)を媒介する(例えば、Dechant, G. & Barde, Y. A., Nat Neurosci. 5, 1131-1136 (2002)を参照のこと)。近年の研究において、p75は、軸索伸長の調節にも関連付けられている。

#### 【0279】

p75は、代表的に、配列番号3または16(核酸配列、それぞれヒトまたはラット)および配列番号4または17(アミノ酸配列、それぞれヒトまたはラット)に示す配列を有し、その改変体およびフラグメントもまた、生物学的活性を有する限り、p75の定義内に含まれる。p75の生物学的活性としては、例えば、ニューロトロフィンによる神経突起伸長の促進が挙げられるがそれらに限定されず、そのような活性は、ニューロトロフィンによるRhoの活性阻害のようなアッセイで測定することができる。

#### 【0280】

本明細書において「p75細胞外ドメイン」とは、細胞膜上に一回膜貫通型レセプターとして存在しているp75のアミノ末端で細胞外にある部分をいう。p75細胞外ドメインは、代表的に、配列番号3(核酸配列、ヒト)の1110位~1283位または配列番号16(核酸配列、ラット)の1113位~1277位および配列番号4(アミノ酸配列、ヒト)の273位~427位、または配列番号17(アミノ酸配列、ラット)の274位~425位に示す配列を有し、その改変体およびフラグメントもまた、生物学的活性を有する限り、p75細胞外ドメインの定義内に含まれる。またこのp75細胞外ドメインの上記のような特定の動物の他の種の対応するペプチドもまた、本発明の範囲内に入る。p75細胞外ドメインの生物学的活性としては、例えば、ミエリン由来タンパク質による神経突起伸展阻害のブロックが挙げられるがそれらに限定されず、そのような活性は、ミエリン由来タンパク質によるRhoの活性化のブロックのようなアッセイで測定することができる。

#### 【0281】

本明細書中では、「p75細胞外ドメイン」はまた「可溶性p75ポリペプチド」とも称される。したがって、可溶性p75ポリペプチドは、それ自体が膜中に係留していないp75ポリペプチドである。このような、可溶性ポリペプチドとしては、例えば、そのポリペプチドを係留するのに十分なその膜貫通部分を欠いているに改変されている、p75ポリペプチドが挙げられるがそれに限定されない。好ましい実施形態において、5、10、20または25アミノ酸までが、p75のC末端から除去され、各タンパク質を可溶性にする。

#### 【0282】

可溶性p75ポリペプチドとしては、推定GPIシグナル配列までの全p75タンパク質を含み得る。他の実施形態において、これらのタンパク質のシグナルペプチドは、除去され得るかまたは短縮化され得る。

#### 【0283】

用語「Rho GDP解離抑制タンパク質」または「Rho GDI」は、交換可能に使用され、ヌクレオチド解離の阻害ならびに細胞質と膜との間のRhoタンパク質の往復に役割をはたすタンパク質である(例えば、Sasaki, T. & Takai, Y., Biochem Biophys Res Commun. 245, 641-645 (1998)を参照のこと)。Rho GDIは、Rhoファミリーのタンパク質が、膜に転位する活性なGTP結合形態に変換されることを妨げる。さらに、Rhoタンパク質の活性形態が膜において不活性形態に変換された後、Rho GDIは、そのRhoタンパク質と複合体を形成し、そして細胞質ゾルに転位する。Rho GDIファミリーは、少なくとも3つのアイソフォーム: Rho GDI $\alpha$ 、Rho GDI $\beta$ 、およびRho GDI $\gamma$ を含む。Rho GDI $\alpha$ は、遍在的に発現し、これまで研究されているRhoファミリーのタンパク質の全てに結合し、一方、Rho GDI $\beta$ およびRho GDI $\gamma$ は、特有の組織発現パターンを示す。Rho GDIは、代表的に、配列番号5(核酸配列)および配列番号6(アミノ酸配列)に示す配列を有し、その改変体およびフラグメント

もまた、生物学的活性を有する限り、R h o G D I の定義内に含まれる。R h o G D I の生物学的活性としては、例えば、G D P 結合型 R h o との結合が挙げられるがそれらに限定されず、そのような活性は、G D P - G T P E x c h a n g e A s s a y のようなアッセイで測定することができる。

#### 【0284】

本明細書において「M A G」または「ミエリン結合糖タンパク質」とは、互換可能に使用され、m y e l i n - a s s o c i a t e d g l y c o p r o t e i n の略であり、オリゴデンドロサイト・シュワン細胞の膜上に存在する糖タンパク質をさす。M A G は、代表的に、配列番号 7 (核酸配列) および配列番号 8 (アミノ酸配列) に示す配列を有し、その改変体およびフラグメントもまた、生物学的活性を有する限り、M A G の定義内に含まれる。M A G の生物学的活性としては、例えば、神経突起伸展阻害が挙げられるがそれらに限定されず、そのような活性は、神経細胞において R h o を活性化することを確認するようなアッセイで測定することができる。

#### 【0285】

本明細書において「N o g o」とは、オリゴデンドロサイトの細胞膜上に存在する、2 回膜貫通型タンパク質をいう。N o g o は、代表的に、配列番号 9 (核酸配列) および配列番号 10 (アミノ酸配列) に示す配列を有し、その改変体およびフラグメントもまた、生物学的活性を有する限り、N o g o の定義内に含まれる。N o g o の生物学的活性としては、例えば、神経細胞の突起伸展阻害が挙げられるがそれらに限定されず、そのような活性は、神経細胞の R h o の活性化を見るアッセイなどで測定することができる。

#### 【0286】

用語「R h o」とは、アクチン重合化の状態を調節する低分子 G T P a s e である。その活性な G T P 結合形態において、R h o は、アクチン細胞骨格を堅くし、それによって、軸索伸長を阻害し、そして成長円錐の崩壊を媒介する (例えば、D a v i e s , A . M . , C u r r . B i o l . 10, R 198-200 (2000)、および S c h m i d t , A . & H a l l , A . , G e n e s D e v . 16, 1587-1609 (2002) を参照のこと)。R h o は、代表的に、以下に説明する R h o A の配列である、配列番号 11 (核酸配列) および配列番号 12 (アミノ酸配列) に示す配列を有し、その改変体およびフラグメントもまた、生物学的活性を有する限り、R h o の定義内に含まれる。R h o の生物学的活性としては、例えば、神経突起の伸展制御が挙げられるがそれらに限定されず、そのような活性は、エフェクタータンパク質を用いた A f f i n i t y P r e c i p i t a t i o n (親和性沈降) のようなアッセイで測定することができる。

#### 【0287】

本明細書において「R h o A」とは、R h o ファミリーのメンバーである分子であり、代表的に、配列番号 11 (核酸配列) および配列番号 12 (アミノ酸配列) に示す配列を有し、その改変体およびフラグメントもまた、生物学的活性を有する限り、R h o A の定義内に含まれる。R h o A の生物学的活性としては、例えば、神経突起の伸展制御が挙げられるがそれらに限定されず、そのような活性は、エフェクタータンパク質を用いた親和性沈降のようなアッセイで測定することができる。

#### 【0288】

本明細書において「R h o キナーゼ」とは、R h o によってリン酸化機能が調節される機能を有する生体分子をいう。R h o キナーゼは、代表的には、配列番号 18 (核酸配列) および配列番号 19 (アミノ酸配列) を有し、その改変体およびフラグメントもまた、生物学的活性 (代表的には、リン酸化する活性、R h o によって調節されることなど) を有する限り、R h o キナーゼの定義内に含まれる。

#### 【0289】

本明細書において「G T 1 b」とは、ガングリオシドの一種である分子であり、当該分野において定義されるのと同じ意味で用いられる。G T 1 b の生物学的活性としては、例えば、M A G または p 7 5 への結合が挙げられるがそれらに限定されず、そのような活性は、M A G または p 7 5 への結合実験のようなアッセイで測定することができる。M A G

との結合という意味においてG T 1 bと同等の働きを有する分子としては、たとえば、G D 1 a、 $\alpha$ 系列のガングリオシドなどが挙げられるがそれらに限定されない。ここで、G T 1 b以外のこのようなガングリオシドは、G T 1 bとの競争阻害作用を有し得ることから、MAGのインヒビターとして使用することが可能である。

#### 【0290】

本明細書において「p 2 1」とは、サイクリン依存性タンパク質キナーゼインヒビター (cyclin-dependent protein kinase inhibitor) の一分子であり、別名W A F 1またはC i p 1とも呼ばれる。したがって、本明細書では、「p 2 1」は、「p 2 1<sup>C i p 1 / W A F 1</sup>」とも表記される(原則として、p 2 1という表記に統一いたしました)。p 2 1は、代表的に、配列番号13または配列番号22(核酸配列)および配列番号14または配列番号23(アミノ酸配列)に示す配列を有し、その改変体およびフラグメントもまた、生物学的活性を有する限り、p 2 1の定義内に含まれる。p 2 1の生物学的活性としては、例えば、細胞サイクルの停止が挙げられるがそれらに限定されず、そのような活性は、神経細胞の分子誘導のようなアッセイで測定することができる。

#### 【0291】

p 2 1遺伝子は、C d k 2との相互作用を介して同定され(Harper, J. W., G. R. Adami, N. Wei, K. Keyomarsi, およびS. J. Elledge. 1993., Cell. 75:805-816)、そしてその発現は、野生型p 5 3の活性化によって(El-Deiry, W. S., T. Tokino, V. E. Velculescu, D. B. Levy, R. Parsons, J. M. Trent, D. Lin, W. E. Mercer, K. W. Kinzler, およびB. Vogelstein. 1993, Cell. 75:817-825)、ならびに細胞老化の間(Noda, A., Y. Ning, S. F. Venable, O. M. Pereira-Smith, およびJ. R. Smith. 1994., Exp. Cell. Res. 211:90-98)および分化の間(Jiang, H., J. Lin, Z. Z. Su, F. R. Collart, E. Huberman, およびP. B. Fisher. 1994., Oncogene. 9:3397-3406)に誘導される。p 2 1のNH<sub>2</sub>末端ドメインは、サイクリン-C d k キナーゼを阻害し、そしてp 2 1のCOOH-末端ドメインは、増大している細胞核抗原を阻害する(Waga, S., G. J. Hannon, D. Beach, およびB. Stillman. 1994., Nature. 369:574-578; Chen, J., P. K. Jackson, M. W. Kirschner, およびA. Dutta. 1995. Nature. 374:386-388; Luo, Y., J. Hurwitz, およびJ. Massague. 1995., Nature. 375:159-161; Sherr, C. J., およびJ. M. Roberts. 1995., Genes. Dev. 9:1149-1163)。p 2 1のこれらの細胞周期阻害活性は、その核局在化に起因する(Goubin, F., およびB. Ducommun. 1995., Oncogene. 10:2281-2287; Sherr, C. J., およびJ. M. Roberts. 1995. Genes. Dev. 9:1149-1163)。しかし、近年の研究によって、p 2 1は細胞質において他の生物学的活性を有することが証明された。ビタミンD<sub>3</sub>を用いた処理による、U 9 3 7細胞およびH L 6 0細胞の単球分化のプロセスの間に、p 2 1発現が細胞質で誘導され、そしてこの細胞質p 2 1は、アポトーシスシグナル調節キナーゼ1と複合体を形成し、ストレス活性化MAP Kカスケードを阻害し、ゆえに、種々のアポトーシス生成(apoptogenic)刺激に対する耐性の獲得に寄与する(Asada, M., T. Yamada, H. Ichijo, D. Delia, K. Miyazono, K. Fukumuro, およびS. Mizutani. 1999., EMBO. J. 18:1223-1234)。p 2 1の細胞質局在はまた、末梢血単球においても観察されている(Asada, M., T. Yamada, H. Ichijo, D. Delia, K. Miyazono, K. Fukumuro, およびS. Mizutani. 1999., EMBO. J. 18:1223-1234)。いくつかの報告

によって、核から細胞質へのp21の可能性のある転移機構が提案されている。ホスファチジルイノシトール-3キナーゼ/Aktがp21のCOOH末端NLS中のトレオニン145をリン酸化し、そしてリン酸化されたp21は核に局在する能力を欠くことが報告されている(Zhou, B. P., Y. Liao, W. Xia, B. Spohn, M. H. Lee, およびM. C. Hung. 2001., *Nat. Cell. Biol.* 3:245-252)。他の論文は、プロテアーゼのカスパーゼファミリーのメンバーによるp21のCOOH末端の短縮化がそのNLSの欠失および局在の変化を引き起こすことを示している(Levkau, B., H. Koyama, E. W. Raines, B. E. Clurman, B. Herren, K. Orth, J. M. Roberts, およびR. Ross. 1998., *Mol. Cell.* 1:553-563)。

#### 【0292】

ニューロン細胞の分化過程の間、p21はまた、細胞周期の調節に重要な役割を果たす。いくつかの細胞株において、神経成長因子での処理後の間に、p21タンパク質の発現が増大する(Decker, S. J. 1995., *J. Biol. Chem.* 270:30841-30844; Dobashi, Y., T. Kudoh, A. Matsumine, K. Toyoshima, およびT. Akiyama. 1995., *J. Biol. Chem.* 270:23031-23037; Yan, G. Z., およびE. B. Ziff. 1995., *J. Neurosci.* 15:6200-6212; Poluha, W., D. K. Poluha, B. Chang, N. E. Crosbie, C. M. Schonhoff, D. L. Kilpatrick, およびA. H. Ross. 1996., *Mol. Cell. Biol.* 16:1335-1341; van Grunsven, L. A., N. Billon, P. Savatier, A. Thomas, J. L. Urdiales, およびB. B. Rudkin. 1996., *Oncogene*. 12:1347-1356; Gollapudi, L., およびK. E. Neet. 1997., *J. Neurosci. Res.* 49:461-474; Erhardt, J. A., およびR. N. Pittman. 1998., *J. Biol. Chem.* 273:23517-23523)。しかし、分化後のニューロンは、他の細胞型と異なり特別な特性を有するようである。なぜなら、新生ニューロンは、軸索および樹状突起を伸長して、適切な標的と連絡するからである。例えば、生後3日~4日までの脊髄神経節ニューロンまたは胚性網膜神経節ニューロンは、急速にその神経突起をミエリン結合糖タンパク質(これは、成体ニューロンの有効な神経突起伸展インヒビターである)にまで伸長し得る(Johnson, P. W., W. Abramow-Newerly, B. Seilheimer, R. Sadoul, M. B. Tropak, M. Arquint, R. J. Dunn, M. Schachner, およびJ. C. Roder. 1989., *Neuron*. 3:377-385; Mukhopadhyay, G., P. Doherty, F. S. Walsh, P. R. Crocker, およびM. T. Filbin. 1994., *Neuron*. 13:757-767; DeBellard, M. E., S. Tang, G. Mukhopadhyay, Y. J. Shen, およびM. T. Filbin. 1996., *Mol. Cell. Neurosci.* 7:89-101; ならびに、Cai, D., J. Qiu, Z. Cao, M. McAtee, B. S. Bregman, およびM. T. Filbin. 2001., *J. Neurosci.* 21:4731-4739)。これらの知見は、未成熟のニューロンが、阻害分子に対する耐性を与える固有の機構を有し得ることを示唆する。

#### 【0293】

本明細書において「PKC」とは、プロテインキナーゼCの略称であり、プロテインキナーゼのうち、ATPの $\gamma$ -リン酸基を蛋白質に存在するある特定のセリンまたはスレオニンの水酸基に転移させる反応を触媒する酵素(EC2.7.1.37)をいう。PKCは、ジアシルグリセロールにより活性化されて、細胞内の種々の機能タンパク質などをリン酸化し、その結果、基質タンパク質の活性が変化し、細胞外からの刺激に対する生理応答が発現される。PKCの活性発現には $Ca^{2+}$ とホスファチジルセリンなどリン脂質が必須であり、ジ

アシルグリセロールはPKCの $Ca^{2+}$ に対する親和性を上昇させるといわれている。PKCは分子量約8万の単一ペプチドであり、 $\alpha$ 、 $\beta$ I、 $\beta$ II、 $\gamma$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 、 $\zeta$ 、 $\eta$ などのアイソザイムが存在する。本明細書において特に意図されるのは、PKC $\alpha$ であり、配列番号26（アミノ酸配列は配列番号27）のものが代表例として挙げられる。

#### 【0294】

本明細書において「IP<sub>3</sub>」とは、1,4,5-IP<sub>3</sub>とも略記され、一般にはイノシトール-1,4,5-三リン酸をいう。サイトカイン、ホルモンなどの刺激により活性化された細胞内のホスホリパーゼCがホスファチジルイノシトール-4,5-二リン酸を加水分解することにより産生されるセカンドメッセンジャーの一つである。小胞体に存在するIP<sub>3</sub>レセプターに結合し、小胞体から $Ca^{2+}$ を遊離させることにより細胞内の $Ca^{2+}$ 濃度を上昇させる。

#### 【0295】

本明細書において「PLC」とは、ホスホリパーゼCの略称をいい、EC3.1.4.3に分類され、代表的にはレシチン（ホスファチジルコリン）をジグリセリドとコリンのリン酸エステルとに加水分解する活性を有する。

#### 【0296】

本明細書において「Gタンパク質共役型レセプター」とは、細胞膜7回貫通型レセプターであり、三量体型Gタンパク質と共役しているレセプターをいう。この型はさらにcAMPをセカンドメッセンジャーとして産生するcAMP系およびイノシトール-1,4,5-三リン酸（IP<sub>3</sub>）またはジアシルグリセロール（DG）をセカンドメッセンジャーとするイノシトールリン脂質情報伝達系とに分けられる。cAMPは、いくつかの経路を単独あるいは並行して活性化することができる。嗅覚受容神経細胞をはじめとする一部の神経細胞などでは、cAMP依存性イオンチャネルを開かせ、細胞膜電位を脱分極させると同時に、このチャネルを通り細胞外からの $Ca^{2+}$ 流入が生じるために一過性の細胞内 $Ca^{2+}$ 濃度上昇が起きる。また、cAMPは、cAMP依存性のキナーゼ（Aキナーゼ）を活性化し、機能タンパク質のセリンおよび/またはスレオニン残基のリン酸化を起こし、活性を修飾する。他方IP<sub>3</sub>は小胞体上のIP<sub>3</sub>レセプターに結合し、 $Ca^{2+}$ の細胞内への遊離を促し、ジアシルグリセロールはCキナーゼを活性化してホルモンなどの作用発現を促す。

#### 【0297】

一般にGsと呼ばれる促進性Gタンパク質が活性化されると、cAMP合成を担うアデニル酸シクラーゼが活性化され、cAMPレベルが上昇する。Giと呼ばれる抑制性Gタンパク質が活性化されると、アデニル酸シクラーゼが抑制されたcAMPが低下する。視細胞のトランスデューシンはGiの一種であり、これが活性化されるとcGMP分解酵素であるホスホジエステラーゼが活性化されて、cGMPレベルが低下する。Gqと呼ばれるGタンパク質は、活性化されると、ホスホリパーゼCが活性化されて、IP<sub>3</sub>が産生される。これらの経路のいずれもが、本発明において使用され得る。

#### 【0298】

本明細書において、「Gタンパク質」とは、グアニンヌクレオチド結合性調節タンパク質をいい、GTP（グアノシン5'三リン酸）またはGDP（グアノシン5'二リン酸）と特異的に結合し、結合したGTPをGDPとリン酸とに分解する酵素活性を示すGTP結合タンパク質のである。代表的に、Gタンパク質は、ホルモン、サイトカイン、神経伝達物質などのレセプターを介した細胞内シグナル伝達経路で情報を変換し伝達する因子として機能する。3量体型Gタンパク質は $\alpha$ （G $\alpha$ ）、 $\beta$ （G $\beta$ ）、 $\gamma$ （G $\gamma$ ）の3種類のサブユニットからなる。Gタンパク質は、酵母などの単純な構造を有する真核生物からヒト、マウスなどの真核生物にまで広く存在することから、本発明では、そのようなGタンパク質もまた、利用することができる。Gタンパク質の例としては、例えば、G $\alpha$ 、G $\beta$ 、G $\gamma$ が挙げられるがそれに限定されない。Gタンパク質は、通常 $\alpha\beta\gamma$ （G $\alpha\beta\gamma$ ）の複合体として存在し、膜を7回貫通する構造を有するレセプター（Gタンパク質共役型レセプター）により活性化される。細胞外の第1メッセンジャーにより活性化されたGタンパク質共役型レセプターは、G $\alpha$ に結合しているGDPをGTPに交換する。GTPが結

合した  $G\alpha$  は  $G\beta\gamma$  と解離し、 $G\alpha$  と  $G\beta\gamma$  は独立にあるいは相互にアデニル酸シクラーゼなど細胞内の第2メッセンジャーの量を変動する酵素、イオンチャネルの活性などを調節する。 $G\alpha$  自身の酵素活性により GTP が GDP に分解されると、 $G\alpha$  と  $G\beta\gamma$  とは再び結合し不活性型の3量体  $G\alpha\beta\gamma$  に戻る。より好ましくは、 $G\alpha$  タンパク質、 $G\beta$  タンパク質および  $G\gamma$  タンパク質をすべて調節することが有利であり得る。これらのタンパク質は共役を調節することが有利であり得る。

#### 【0299】

本明細書において「TAT PTDドメイン」または「PTDドメイン」とは、互換可能に使用され、ヒト免疫不全ウイルス (HIV) の TAT タンパク質のアミノ末端のアミノ酸配列であって、タンパク質の細胞内導入を促す作用を有するものをいう。代表的に、この配列は、YGRKKRRQRRR (配列番号20) を含むが、それに限定されない。この配列は、任意の作用因子 (例えば、p21、Pep5 など) と融合させることができる。本明細書ではまた、PTDドメインを「TAT」と称することがある。

#### 【0300】

本明細書において「神経再生因子」とは、p75 シグナル伝達経路などの神経再生に関与する因子であって、神経再生 (神経再生の促進または神経抑制の遮断など) の作用を有するものをいう。そのような因子としては、本発明の Pep5 ポリペプチド、Pep5 ポリペプチドをコードする核酸分子、p75 ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、p75 ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、p75 細胞外ドメインポリペプチド、p75 細胞外ドメインポリペプチドをコードする核酸分子、Rhogdi ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、Rhogdi ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、Rhogdi ポリペプチド、Rhogdi ポリペプチドをコードする核酸分子、MAG ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、MAG ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、p21 ポリペプチド、p21 をコードする核酸分子、Rhogdi ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、Rhogdi ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、Rhogdi キナーゼに対して特異的に相互作用する因子および Rhogdi キナーゼをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子ならびにその改変体およびフラグメントなどが挙げられるがそれに限定されない。

#### 【0301】

用語「サイレンシング」または「サイレンシングする」は交換可能に使用され、p75 伝達経路のいずれかの因子を遮断することをいい、たとえば、p75 と Rhogdi との間の相互作用を破壊することをいう。「サイレンサ」は、そのような遮断効果を有する因子、たとえば、p75<sup>NTR</sup> と Rhogdi との間の相互作用を破壊する因子のことをいう。

#### 【0302】

(用語の定義)

以下に本明細書において特に使用される用語の定義を列举する。

#### 【0303】

本明細書において使用される用語「タンパク質」、「ポリペプチド」、「オリゴペプチド」および「ペプチド」は、本明細書において同じ意味で使用され、任意の長さのアミノ酸のポリマーをいう。このポリマーは、直鎖であっても分岐していてもよく、環状であってもよい。アミノ酸は、天然のものであっても非天然のものであってもよく、改変されたアミノ酸であってもよい。この用語はまた、複数のポリペプチド鎖の複合体へとアセンブルされたものを包含し得る。この用語はまた、天然または人工的に改変されたアミノ酸ポリマーも包含する。そのような改変としては、例えば、ジスルフィド結合形成、グリコシル化、脂質化、アセチル化、リン酸化または任意の他の操作もしくは改変 (例えば、標識成分との結合体化)。この定義にはまた、例えば、アミノ酸の1または2以上のアナログを含むポリペプチド (例えば、非天然のアミノ酸などを含む)、ペプチド様化合物 (例えば、ペプチド) および当該分野において公知の他の改変が包含される。本発明の遺伝子

産物（たとえば、Pep5、PKC、p75、Rho GDI、MAG、p21、Rho、Rhoキナーゼなど）は、通常ポリペプチド形態をとる。このようなポリペプチド形態の本発明の遺伝子産物は、本発明の診断、予防、治療または予後のための組成物として有用である。

#### 【0304】

本明細書において使用される用語「ポリヌクレオチド」、「オリゴヌクレオチド」および「核酸」は、本明細書において同じ意味で使用され、任意の長さのヌクレオチドのポリマーをいう。この用語はまた、「誘導体オリゴヌクレオチド」または「誘導体ポリヌクレオチド」を含む。「誘導体オリゴヌクレオチド」または「誘導体ポリヌクレオチド」とは、ヌクレオチドの誘導体を含むか、またはヌクレオチド間の結合が通常とは異なるオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドをいい、互換的に使用される。そのようなオリゴヌクレオチドとして具体的には、例えば、2'-O-メチルリボヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がホスホロチオエート結合に変換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がN3'-P5'ホスホロアミデート結合に変換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のリボースとリン酸ジエステル結合とがペプチド核酸結合に変換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5プロピニルウラシルで置換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5チアゾールウラシルで置換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のシトシンがC-5プロピニルシトシンで置換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のシトシンがフェノキサジン修飾シトシン（phenoxazine-modified cytosine）で置換された誘導体オリゴヌクレオチド、DNA中のリボースが2'-O-プロピルリボースで置換された誘導体オリゴヌクレオチドおよびオリゴヌクレオチド中のリボースが2'-メトキシエトキシリボースで置換された誘導体オリゴヌクレオチドなどが例示される。他にそうではないと示されなければ、特定の核酸配列はまた、明示的に示された配列と同様に、その保存的に改変された改変体（例えば、縮重コドン置換体）および相補配列を包含することが企図される。具体的には、縮重コドン置換体は、1またはそれ以上の選択された（または、すべての）コドンの3番目の位置が混合塩基および/またはデオキシイノシン残基で置換された配列を作成することにより達成され得る（Batzeraら、Nucleic Acid Res. 19:5081（1991）；Ohtsukaら、J. Biol. Chem. 260:2605-2608（1985）；Rossoliniら、Mol. Cell. Probes 8:91-98（1994））。本発明の遺伝子（たとえば、Pep5、PKC、p75、Rho GDI、MAG、p21、Rho、Rhoキナーゼなど）は、通常、このポリヌクレオチド形態をとる。このようなポリヌクレオチド形態の本発明の遺伝子または遺伝子産物は、本発明の診断、予防、治療または予後のための組成物として有用である。

#### 【0305】

本明細書では「核酸分子」もまた、核酸、オリゴヌクレオチドおよびポリヌクレオチドと互換可能に使用され、cDNA、mRNA、ゲノムDNAなどを含む。本明細書では、核酸および核酸分子は、用語「遺伝子」の概念に含まれ得る。ある遺伝子配列をコードする核酸分子はまた、「スプライス変異体（改変体）」を包含する。同様に、核酸によりコードされた特定のタンパク質は、その核酸のスプライス改変体によりコードされる任意のタンパク質を包含する。その名が示唆するように「スプライス変異体」は、遺伝子のオルタナティブスプライシングの産物である。転写後、最初の核酸転写物は、異なる（別の）核酸スプライス産物が異なるポリペプチドをコードするようにスプライスされ得る。スプライス変異体の産生機構は変化するが、エキソンのオルタナティブスプライシングを含む。読み過し転写により同じ核酸に由来する別のポリペプチドもまた、この定義に包含される。スプライシング反応の任意の産物（組換え形態のスプライス産物を含む）がこの定義に含まれる。したがって、本明細書では、たとえば、本発明の遺伝子には、そのスプライス変異体もまた包含され得る。

## 【0306】

本明細書において、「遺伝子」とは、遺伝形質を規定する因子をいう。通常染色体上に一定の順序に配列している。タンパク質の一次構造を規定するものを構造遺伝子といい、その発現を左右するものを調節遺伝子（たとえば、プロモーター）という。本明細書では、遺伝子は、特に言及しない限り、構造遺伝子および調節遺伝子を包含する。したがって、Pep5、PKC、p75、Rho GDI、MAG、p21、Rho、Rhoキナーゼなどの遺伝子というときは、通常、本発明の遺伝子の構造遺伝子ならびにそのプロモーターなどの転写および／または翻訳の調節配列の両方を包含する。本発明では、構造遺伝子のほか、転写および／または翻訳などの調節配列もまた、神経再生、神経疾患の診断、治療、予防、予後などに有用であることが理解される。本明細書では、「遺伝子」は、「ポリヌクレオチド」、「オリゴヌクレオチド」、「核酸」および「核酸分子」ならびに／または「タンパク質」、「ポリペプチド」、「オリゴペプチド」および「ペプチド」を指すことがある。本明細書においてはまた、「遺伝子産物」は、遺伝子によって発現された「ポリヌクレオチド」、「オリゴヌクレオチド」、「核酸」および「核酸分子」ならびに／または「タンパク質」、「ポリペプチド」、「オリゴペプチド」および「ペプチド」を包含する。当業者であれば、遺伝子産物が何たるかはその状況に応じて理解することができる。

## 【0307】

本明細書において遺伝子（例えば、核酸配列、アミノ酸配列など）の「相同性」とは、2以上の遺伝子配列の、互いに対する同一性の程度をいう。また、本明細書において配列（核酸配列、アミノ酸配列など）の同一性とは、2以上の対比可能な配列の、互いに対する同一の配列（個々の核酸、アミノ酸など）の程度をいう。従って、ある2つの遺伝子の相同性が高いほど、それらの配列の同一性または類似性は高い。2種類の遺伝子が相同性を有するか否かは、配列の直接の比較、または核酸の場合ストリンジェントな条件下でのハイブリダイゼーション法によって調べられ得る。2つの遺伝子配列を直接比較する場合、その遺伝子配列間でDNA配列が、代表的には少なくとも50%同一である場合、好ましくは少なくとも70%同一である場合、より好ましくは少なくとも80%、90%、95%、96%、97%、98%または99%同一である場合、それらの遺伝子は相同性を有する。本明細書において、遺伝子（例えば、核酸配列、アミノ酸配列など）の「類似性」とは、上記相同性において、保存的置換をポジティブ（同一）とみなした場合の、2以上の遺伝子配列の、互いに対する同一性の程度をいう。従って、保存的置換がある場合は、その保存的置換の存在に応じて相同性と類似性とは異なる。また、保存的置換がない場合は、相同性と類似性とは同じ数値を示す。

## 【0308】

本明細書では、アミノ酸配列および塩基配列の類似性、同一性および相同性の比較は、配列分析用ツールであるFASTAを用い、デフォルトパラメータを用いて算出される。

## 【0309】

本明細書において、「アミノ酸」は、本発明の目的を満たす限り、天然のものでも非天然のものでもよい。「誘導体アミノ酸」または「アミノ酸アナログ」とは、天然に存在するアミノ酸とは異なるがもとのアミノ酸と同様の機能を有するものをいう。そのような誘導体アミノ酸およびアミノ酸アナログは、当該分野において周知である。用語「天然のアミノ酸」とは、天然のアミノ酸のL-異性体を意味する。天然のアミノ酸は、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、セリン、メチオニン、トレオニン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、システイン、プロリン、ヒスチジン、アスパラギン酸、アスパラギン、グルタミン酸、グルタミン、γ-カルボキシグルタミン酸、アルギニン、オルニチン、およびリジンである。特に示されない限り、本明細書でいう全てのアミノ酸はL体であるが、D体のアミノ酸を用いた形態もまた本発明の範囲内にある。用語「非天然アミノ酸」とは、タンパク質中で通常は天然に見出されないアミノ酸を意味する。非天然アミノ酸の例として、ノルロイシン、パラ-ニトロフェニルアラニン、ホモフェニルアラニン、パラ-フルオロフェニルアラニン、3-アミノ-2-ベンジルプロピオ



ン酸、ホモアルギニンのD体またはL体およびD-フェニルアラニンが挙げられる。「アミノ酸アナログ」とは、アミノ酸ではないが、アミノ酸の物性および／または機能に類似する分子をいう。アミノ酸アナログとしては、例えば、エチオニン、カナバニン、2-メチルグルタミンなどが挙げられる。アミノ酸模倣物とは、アミノ酸の一般的な化学構造とは異なる構造を有するが、天然に存在するアミノ酸と同様な様式で機能する化合物をいう。

#### 【0310】

アミノ酸は、その一般に公知の3文字記号か、またはIUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commissionにより推奨される1文字記号のいずれかにより、本明細書中で言及され得る。ヌクレオチドも同様に、一般に認知された1文字コードにより言及され得る。

#### 【0311】

本明細書において、「対応する」アミノ酸とは、あるタンパク質分子またはポリペプチド分子において、比較の基準となるタンパク質またはポリペプチドにおける所定のアミノ酸と同様の作用を有するか、または有することが予測されるアミノ酸をいい、特に酵素分子にあっては、活性部位中の同様の位置に存在し触媒活性に同様の寄与をするアミノ酸をいう。例えば、アンチセンス分子であれば、そのアンチセンス分子の特定の部分に対応するオルソログにおける同様の部分であり得る。

#### 【0312】

本明細書において、「対応する」遺伝子とは、ある種において、比較の基準となる種における所定の遺伝子と同様の作用を有するか、または有することが予測される遺伝子をいい、そのような作用を有する遺伝子が複数存在する場合、進化学的に同じ起源を有するものをいう。従って、ある遺伝子の対応する遺伝子は、その遺伝子のオルソログであり得る。したがって、マウスのPep5、PKC、p75、RhogDI、MAG、p21、Rhog、Rhogキナーゼなどの遺伝子に対応する遺伝子は、他の動物（ヒト、ラット、ブタ、ウシなど）においても見出すことができる。そのような対応する遺伝子は、当該分野において周知の技術を用いて同定することができる。したがって、例えば、ある動物における対応する遺伝子は、対応する遺伝子の基準となる遺伝子（例えば、マウスのPep5、PKC、p75、RhogDI、MAG、p21、Rhog、Rhogキナーゼなどの遺伝子）の配列をクエリ配列として用いてその動物（例えばヒト、ラット）の配列データベースを検索することによって見出すことができる。

#### 【0313】

本明細書中で使用される「異種」とは、異なる配列または対応しない配列、あるいは異なる種由来の配列である、ヌクレオチド配列またはアミノ酸配列をいう。例えば、マウスMAGのヌクレオチド配列またはアミノ酸配列は、ヒトMAGのヌクレオチド配列またはアミノ酸配列に対して異種であり、そしてヒトMAGの核酸配列またはアミノ酸配列は、ヒトアルブミンのヌクレオチド配列またはアミノ酸配列に対して異種である。

#### 【0314】

本明細書において「ヌクレオチド」は、天然のものでも非天然のものでもよい。「誘導体ヌクレオチド」または「ヌクレオチドアナログ」とは、天然に存在するヌクレオチドとは異なるがもとのヌクレオチドと同様の機能を有するものをいう。そのような誘導体ヌクレオチドおよびヌクレオチドアナログは、当該分野において周知である。そのような誘導体ヌクレオチドおよびヌクレオチドアナログの例としては、ホスホロチオエート、ホスホルアミデート、メチルホスホネート、キラルメチルホスホネート、2-O-メチルリボヌクレオチド、ペプチド-核酸(PNA)が含まれるが、これらに限定されない。

#### 【0315】

本明細書において「フラグメント」とは、全長のポリペプチドまたはポリヌクレオチド（長さがn）に対して、1～n-1までの配列長さを有するポリペプチドまたはポリヌクレオチドをいう。フラグメントの長さは、その目的に応じて、適宜変更することができ、例えば、その長さの下限としては、ポリペプチドの場合、3、4、5、6、7、8、9、

10、15、20、25、30、40、50およびそれ以上のアミノ酸が挙げられ、この具体的に列挙していない整数で表される長さ（例えば、11など）もまた、下限として適切であり得る。また、ポリヌクレオチドの場合、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、40、50、75、100およびそれ以上のヌクレオチドが挙げられ、この具体的に列挙していない整数で表される長さ（例えば、11など）もまた、下限として適切であり得る。本明細書において、ポリペプチドおよびポリヌクレオチドの長さは、上述のようにそれぞれアミノ酸または核酸の個数で表すことができるが、上述の個数は絶対的なものではなく、同じ機能を有する限り、上限または加減としての上述の個数は、その個数の上下数個（または例えば上下10%）のものも含むことが意図される。そのような意図を表現するために、本明細書では、個数の前に「約」を付けて表現することがある。しかし、本明細書では、「約」のあるなしはその数値の解釈に影響を与えないことが理解されるべきである。本明細書において有用なフラグメントの長さは、そのフラグメントの基準となる全長タンパク質の機能のうち少なくとも1つの機能が保持されているかどうかによって決定され得る。

### 【0316】

本明細書において第一の物質または因子が第二の物質または因子に「特異的に相互作用する」とは、第一の物質または因子が、第二の物質または因子に対して、第二の物質または因子以外の物質または因子（特に、第二の物質または因子を含むサンプル中に存在する他の物質または因子）に対するよりも高い親和性で相互作用することをいう。物質または因子について特異的な相互作用としては、例えば、核酸におけるハイブリダイゼーション、タンパク質における抗原抗体反応、リガンド-レセプター反応、酵素-基質反応など、核酸およびタンパク質の両方が関係する場合、転写因子とその転写因子の結合部位との反応など、タンパク質-脂質相互作用、核酸-脂質相互作用などが挙げられるがそれらに限定されない。従って、物質または因子がともに核酸である場合、第一の物質または因子が第二の物質または因子に「特異的に相互作用する」ことには、第一の物質または因子が、第二の物質または因子に対して少なくとも一部に相補性を有することが包含される。また例えば、物質または因子がともにタンパク質である場合、第一の物質または因子が第二の物質または因子に「特異的に相互作用する」こととしては、例えば、抗原抗体反応による相互作用、レセプター-リガンド反応による相互作用、酵素-基質相互作用などが挙げられるがそれらに限定されない。2種類の物質または因子がタンパク質および核酸を含む場合、第一の物質または因子が第二の物質または因子に「特異的に相互作用する」ことには、転写因子と、その転写因子が対象とする核酸分子の結合領域との間の相互作用が包含される。したがって、本明細書においてポリヌクレオチドまたはポリペプチドなどの生物学的因子に対して「特異的に相互作用する因子」とは、そのポリヌクレオチドまたはそのポリペプチドなどの生物学的因子に対する親和性が、他の無関連の（特に、同一性が30%未満の）ポリヌクレオチドまたはポリペプチドに対する親和性よりも、代表的には同等またはより高いか、好ましくは有意に（例えば、統計学的に有意に）高いものを包含する。そのような親和性は、例えば、ハイブリダイゼーションアッセイ、結合アッセイなどによって測定することができる。本明細書において「因子」(agent)としては、意図する目的を達成することができる限りどのような物質または他の要素（例えば、光、放射能、熱、電気などのエネルギー）でもあってもよい。そのような物質としては、例えば、タンパク質、ポリペプチド、オリゴペプチド、ペプチド、ポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、ヌクレオチド、核酸（例えば、cDNA、ゲノムDNAのようなDNA、mRNAのようなRNAを含む）、ポリサッカリド、オリゴサッカリド、脂質、有機低分子（例えば、ホルモン、リガンド、情報伝達物質、有機低分子、コンビナトリアルケミストリで合成された分子、医薬品として利用され得る低分子（例えば、低分子リガンドなど）など）、これらの複合分子が挙げられるがそれらに限定されない。ポリヌクレオチドに対して特異的な因子としては、代表的には、そのポリヌクレオチドの配列に対して一定の配列相同性を（例えば、70%以上の配列同一性）もって相補性を有するポリヌクレオチド、プロモーター領域に結合する転写因子のようなポリペプチドなどが挙げられるがそれらに限

定されない。ポリペプチドに対して特異的な因子としては、代表的には、そのポリペプチドに対して特異的に指向された抗体またはその誘導体あるいはその類似物（例えば、単鎖抗体）、そのポリペプチドがレセプターまたはリガンドである場合の特異的なリガンドまたはレセプター、そのポリペプチドが酵素である場合、その基質などが挙げられるがそれらに限定されない。

#### 【0317】

本明細書中で使用される「化合物」は、任意の識別可能な化学物質または分子を意味し、これらには、低分子、ペプチド、タンパク質、糖、ヌクレオチド、または核酸が挙げられるが、これらに限定されず、そしてこのような化合物は、天然物または合成物であり得る。

#### 【0318】

本明細書において p 75 シグナル伝達経路における「伝達因子」とは、p 75 シグナル伝達経路において、シグナルを伝達する役割を担う分子をいう。そのような分子としては、例えば、MAG、Nogo、PKC、IP<sub>3</sub>、GTPb、p 75、Rho GDI、Rho、p 21 および Rho キナーゼなどが挙げられるがそれらに限定されない。

#### 【0319】

本明細書において p 75 シグナル伝達経路の「抑制」および「阻害」とは、そのシグナル伝達経路が一部または全部遮断され、その結果シグナルが完全には伝達されなくなる（好ましくは、全く伝達されない）ことをいう。本明細書において p 75 シグナル伝達経路の伝達因子の「阻害」および「阻害」もまた、本明細書において同様に解され、シグナル伝達経路の伝達因子が一部または全部機能しなくなり、その結果シグナルが完全には伝達されなくなる（好ましくは、全く伝達されない）ことをいう。そのような抑制または阻害の機構としては、例えば、MAG、Nogo、PKC、IP<sub>3</sub>、GTPb、p 75、Rho GDI、Rho、p 21 および Rho キナーゼなどを変異、抑制または阻害あるいは消失させることが挙げられるがそれらに限定されない。

#### 【0320】

本明細書において「有機低分子」とは、有機分子であって、比較的分子量が小さなものをいう。通常有機低分子は、分子量が約 1000 以下のものをいうが、それ以上のものであってもよい。有機低分子は、通常当該分野において公知の方法を用いるかそれらを組み合わせて合成することができる。そのような有機低分子は、生物に生産させてもよい。有機低分子としては、例えば、ホルモン、リガンド、情報伝達物質、有機低分子、コンビナトリアルケミストリで合成された分子、医薬品として利用され得る低分子（例えば、低分子リガンドなど）などが挙げられるがそれらに限定されない。

#### 【0321】

本明細書中で使用される「接触（させる）」とは、化合物を、直接的または間接的のいずれかで、本発明のポリペプチドまたはポリヌクレオチドに対して物理的に近接させることを意味する。ポリペプチドまたはポリヌクレオチドは、多くの緩衝液、塩、溶液などに存在し得る。接触とは、核酸分子またはそのフラグメントをコードするポリペプチドを含む、例えば、ビーカー、マイクロタイタープレート、細胞培養フラスコまたはマイクロアレイ（例えば、遺伝子チップ）などに化合物を置くことが挙げられる。

#### 【0322】

本明細書において用いられる用語「抗体」は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、多重特異性抗体、キメラ抗体、および抗イディオタイプ抗体、ならびにそれらの断片、例えば F (ab')<sub>2</sub> および Fab 断片、ならびにその他の組換えにより生産された結合体を含む。さらにこのような抗体を、酵素、例えばアルカリホスファターゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ、 $\alpha$  ガラクトシダーゼなど、に共有結合させまたは組換えにより融合させてよい。

#### 【0323】

本明細書中で使用される「モノクローナル抗体」は、同質な抗体集団を有する抗体組成物をいう。この用語は、それが作製される様式によって限定されない。この用語は、全免

疫グロブリン分子ならびに Fab 分子、F(ab')<sub>2</sub> フラグメント、Fv フラグメント、およびもとのモノクローナル抗体分子の免疫学的結合特性を示す他の分子を含む。ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体を作製する方法は当該分野で公知であり、そして以下でより十分に記載される。

#### 【0324】

モノクローナル抗体は、当該分野で周知の標準的な技術（例えば、Kohler および Milstein, Nature (1975) 256:495）またはその改変（例えば、Buck ら (1982) In Vitro 18:377）を使用して調製される。代表的には、マウスまたはラットを、タンパク質キャリアに結合したタンパク質で免疫化し、追加免疫し、そして脾臓（および必要に応じていくつかの大きなリンパ節）を取り出し、そして単一細胞を解離する。必要に応じて、この脾臓細胞は、非特異的接着細胞の除去後、抗原でコーティングされたプレートまたはウェルに細胞懸濁液を適用することにより、スクリーニングされ得る。抗原に特異的なイムノグロブリンを発現する B 細胞がプレートに結合し、そして懸濁液の残渣でもリンス除去されない。次いで、得られた B 細胞（すなわちすべての剥離した脾臓細胞）をミエローマ細胞と融合させて、ハイブリドーマを得、このハイブリドーマを用いてモノクローナル抗体を産生させる。

#### 【0325】

本明細書において「抗原」(antigen) とは、抗体分子によって特異的に結合され得る任意の基質をいう。本明細書において「免疫原」(immunogen) とは、抗原特異的免疫応答を生じるリンパ球活性化を開始し得る抗原をいう。

#### 【0326】

本明細書において「単鎖抗体」とは、Fv 領域の重鎖フラグメントおよび軽鎖フラグメントがアミノ酸架橋を介して連結されることによって形成され、単鎖ポリペプチドを生じたものをいう。

#### 【0327】

本明細書において「複合分子」とは、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、脂質、糖、低分子などの分子が複数種連結してできた分子をいう。そのような複合分子としては、例えば、糖脂質、糖ペプチドなどが挙げられるがそれらに限定されない。本明細書では、Pepp5、PKC、p75、RhogDI、MAG、p21、Rho、Rho キナーゼまたはその改変体もしくはフラグメントなどをコードする核酸分子またはその産物あるいは GT1b または本発明の因子と同様の機能を有する限り、それぞれ Pepp5、PKC、p75、RhogDI、MAG、p21、Rho、Rho キナーゼまたはその改変体もしくはフラグメントなどをコードする核酸分子またはその産物あるいは GT1b または本発明の因子としてそのような複合分子も使用することができる。

#### 【0328】

本明細書において「単離された」生物学的因子（例えば、核酸またはタンパク質など）とは、その生物学的因子が天然に存在する生物体の細胞内の他の生物学的因子（例えば、核酸である場合、核酸以外の因子および目的とする核酸以外の核酸配列を含む核酸；タンパク質である場合、タンパク質以外の因子および目的とするタンパク質以外のアミノ酸配列を含むタンパク質など）から実質的に分離または精製されたものをいう。「単離された」核酸およびタンパク質には、標準的な精製方法によって精製された核酸およびタンパク質が含まれる。したがって、単離された核酸およびタンパク質は、化学的に合成した核酸およびタンパク質を包含する。

#### 【0329】

本明細書において「精製された」生物学的因子（例えば、核酸またはタンパク質など）とは、その生物学的因子に天然に随伴する因子の少なくとも一部が除去されたものをいう。したがって、通常、精製された生物学的因子におけるその生物学的因子の純度は、その生物学的因子が通常存在する状態よりも高い（すなわち濃縮されている）。

#### 【0330】

本明細書中で使用される用語「精製された」および「単離された」は、好ましくは少な

くとも75重量%、より好ましくは少なくとも85重量%、よりさらに好ましくは少なくとも95重量%、そして最も好ましくは少なくとも98重量%の、同型の生物学的因子が存在することを意味する。

#### 【0331】

本明細書において遺伝子、ポリヌクレオチド、ポリペプチドなど遺伝子産物の「発現」とは、その遺伝子などがインビボで一定の作用を受けて、別の形態になることをいう。好ましくは、遺伝子、ポリヌクレオチドなどが、転写および翻訳されて、ポリペプチドの形態になることをいうが、転写されてmRNAが作製されることもまた発現の一形態であり得る。より好ましくは、そのようなポリペプチドの形態は、翻訳後プロセッシングを受けたものであり得る。

#### 【0332】

従って、本明細書において遺伝子、ポリヌクレオチド、ポリペプチドなどの「発現」の「減少」とは、本発明の因子を作用させたときに、作用させないときよりも、発現の量が有意に減少することをいう。好ましくは、発現の減少は、ポリペプチド（例えば、Pep5、PKC、p75、Rho GDI、MAG、p21、Rho、Rhoキナーゼまたはその改変体もしくはフラグメントなど）の発現量の減少を含む。本明細書において遺伝子、ポリヌクレオチド、ポリペプチドなどの「発現」の「増加」とは、本発明の因子を作用させたときに、作用させないときよりも、発現の量が有意に増加することをいう。好ましくは、発現の増加は、ポリペプチド（例えば、Pep5、PKC、p75、Rho GDI、MAG、p21、Rho、Rhoキナーゼまたはその改変体もしくはフラグメントなど）の発現量の増加を含む。本明細書において遺伝子の「発現」の「誘導」とは、ある細胞にある因子を作用させてその遺伝子の発現量を増加させることをいう。したがって、発現の誘導は、まったくその遺伝子の発現が見られなかった場合にその遺伝子が発現するようにすること、およびすでにその遺伝子の発現が見られていた場合にその遺伝子の発現が増大することを包含する。このような遺伝子または遺伝子産物（ポリペプチドまたはポリヌクレオチド）の発現の増加または減少は、本発明の治療形態、予後形態または予防形態において有用であり得る。

#### 【0333】

本明細書において、遺伝子が「特異的に発現する」とは、その遺伝子が、植物の特定の部位または時期において他の部位または時期とは異なる（好ましくは高い）レベルで発現されることをいう。特異的に発現するとは、ある部位（特異的部位）にのみ発現してもよく、それ以外の部位においても発現していてもよい。好ましくは特異的に発現するとは、ある部位においてのみ発現することをいう。したがって、本発明において、ある実施形態では、罹患した箇所（例えば、神経）に局所的にPep5、PKC、p75、Rho GDI、MAG、p21、Rho、Rhoキナーゼまたはその改変体もしくはフラグメントなどを特異的に発現させてもよい。

#### 【0334】

本明細書において「生物学的活性」とは、ある因子（例えば、ポリヌクレオチド、タンパク質など）が、生体内において有し得る活性のことをいい、種々の機能（例えば、転写促進活性）を発揮する活性が包含される。例えば、2つの因子が相互作用する（例えば、Pep5とp75、p75とRho GDI、MAGとp75、GT1bとp75とが結合する）場合、その生物学的活性は、その二分子との間の結合およびそれによって生じる生物学的変化、例えば、一つの分子を抗体を用いて沈降させたときに他の分子も共沈するとき、2分子は結合していると考えられる。したがって、そのような共沈を見ることが一つの判断手法として挙げられる。また、神経突起の伸展を指標にしてある分子と他の分子とが機能的に関連していると関連付けることができる。具体的には、MAG、GT1b、p75、Rho GDIは相互に関連して神経突起の伸展を阻害するが、Pep5およびp21は、その作用をブロックすることを確認することなどを包含する。例えば、ある因子が酵素である場合、その生物学的活性は、その酵素活性を包含する。別の例では、ある因子がリガンドである場合、そのリガンドが対応するレセプターへの結合を包含する。そ

のような生物学的活性は、当該分野において周知の技術によって測定することができる。

#### 【0335】

したがって、「活性」は、結合（直接的または間接的のいずれか）を示すかまたは明らかにするか；応答に影響する（すなわち、いくらかの曝露または刺激に応答する測定可能な影響を有する）、種々の測定可能な指標をいい、例えば、本発明のポリペプチドまたはポリヌクレオチドに直接結合する化合物の親和性、または例えば、いくつかの刺激後または事象後の上流または下流のタンパク質の量あるいは他の類似の機能の尺度が、挙げられる。このような活性は、G T 1 b に対する M A G 結合の競合阻害のようなアッセイによって測定され得る。ここでは、例えば、標識していない可溶性 M A G が、漸増濃度でアッセイ系に添加され、C H O 細胞の表面上に発現された p 7 5 - G T 1 b に対する M A G の結合を阻害する。別の例として、神経損傷（S c h n e l l および S c h w a b (1990) N a t u r e 343、269-272のような）によって引き起こされた病変を横切って伸長するニューロンの能力を評価し得る。

#### 【0336】

本明細書において「相互作用」とは、2つの物質についていうとき、一方の物質と他方の物質との間で力（例えば、分子間力（ファンデルワールス力）、水素結合、疎水性相互作用など）を及ぼしあうこという。通常、相互作用をした2つの物質は、会合または結合している状態にある。

#### 【0337】

本明細書中で使用される用語「結合」は、2つのタンパク質もしくは化合物または関連するタンパク質もしくは化合物の間、あるいはそれらの組み合わせの間での、物理的相互作用または化学的相互作用を意味する。結合には、イオン結合、非イオン結合、水素結合、ファンデルワールス結合、疎水性相互作用などが含まれる。物理的相互作用（結合）は、直接的または間接的であり得、間接的なものは、別のタンパク質または化合物の効果を介するかまたは起因する。直接的な結合とは、別のタンパク質または化合物の効果を介してもまたはそれらに起因しても起こらず、他の実質的な化学中間体を伴わない、相互作用をいう。

#### 【0338】

本明細書中で使用される用語「調節する (modulate)」または「改変する (modify)」は、特定の活性、因子またはタンパク質の量、質または効果における増加または減少あるいは維持を意味する。

#### 【0339】

本明細書において「アンチセンス（活性）」とは、標的遺伝子の発現を特異的に抑制または低減することができる活性をいう。アンチセンス活性は、通常、目的とする遺伝子（例えば、P e p 5、P K C、p 7 5、R h o G D I、M A G、p 2 1、R h o、R h o キナーゼまたはその改変体もしくはフラグメントなど）の核酸配列と相補的な、少なくとも8の連続するヌクレオチド長の核酸配列によって達成される。そのような核酸配列は、好ましくは、少なくとも9の連続するヌクレオチド長の、より好ましくは10の連続するヌクレオチド長の、さらに好ましくは11の連続するヌクレオチド長の、12の連続するヌクレオチド長の、13の連続するヌクレオチド長の、14の連続するヌクレオチド長の、15の連続するヌクレオチド長の、20の連続するヌクレオチド長の、25の連続するヌクレオチド長の、30の連続するヌクレオチド長の、40の連続するヌクレオチド長の、50の連続するヌクレオチド長の、核酸配列であり得る。そのような核酸配列を有する分子を本明細書において「アンチセンス分子」、「アンチセンス核酸分子」または「アンチセンス核酸」と称し、これらは互換的に使用される。そのような核酸配列には、上述の配列に対して、少なくとも70%相同な、より好ましくは、少なくとも80%相同な、さらに好ましくは、90%相同な、もっとも好ましくは95%相同な核酸配列が含まれる。そのようなアンチセンス活性は、目的とする遺伝子の核酸配列の5'末端の配列に対して相補的であることが好ましい。そのようなアンチセンスの核酸配列には、上述の配列に対して、1つまたは数個あるいは1つ以上のヌクレオチドの置換、付加および／または欠失を

有するものもまた含まれる。本明細書中で開示される核酸配列（例えば、配列番号1、3、5、7、9、11または13など）が与えられれば、本発明のアンチセンス核酸は、WatsonおよびCrick塩基対形成の法則またはHoogsteen塩基対形成の法則に従い設計され得る。アンチセンス核酸分子は、p75シグナル伝達因子のmRNAの全コード領域に相補的であり得るが、より好ましくは、p75シグナル伝達因子のmRNAのコード領域または非コード領域の一部のみに対してアンチセンスであるオリゴヌクレオチドである。例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、p75シグナル伝達因子のmRNAの翻訳開始部位の周辺の領域に相補的であり得る。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、例えば、約5、約10、約15、約20、約25、約30、約35、約40、約45、または約50ヌクレオチド長であり得る。本発明のアンチセンス核酸は、当該分野で公知の手順を用いて、化学合成または酵素的連結反応を用いて構築され得る。例えば、アンチセンス核酸（例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチド）は、天然に存在するヌクレオチド、またはその分子の生物学的安定性を増加させるかもしくはアンチセンス核酸とセンス核酸との間で形成された二本鎖の物理的安定性を増加させるように設計された種々の改変ヌクレオチドを用いて（例えば、ホスホロチオエート誘導体およびアクリジン置換ヌクレオチドが使用され得る）化学合成され得る。アンチセンス核酸を生成するために使用され得る改変ヌクレオチドの例として、5-フルオロウラシル、5-ブロモウラシル、5-クロロウラシル、5-ヨードウラシル、ヒポキサンチン、キサンチン、4-アセチルシトシン、5-（カルボキシヒドロキシメチル）ウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウリジン、5-カルボキシメチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、 $\beta$ -D-ガラクトシルキューオシン（queosine）、イノシン、N6-イソペンテニルアデニン、1-メチルグアニン、1-メチルイノシン、2, 2-ジメチルグアニン、2-メチルアデニン、2-メチルグアニン、3-メチルシトシン、5-メチルシトシン、N6-アデニン、7-メチルグアニン、5-メチルアミノメチルウラシル、5-メトキシアミノメチル-2-チオウラシル、 $\beta$ -D-マンノシルキューオシン、5'-メトキシカルボキシメチルウラシル、5-メトキシウラシル、2-メチルチオ-N6-イソペンテニルアデニン、ウラシル-5-オキシ酢酸（v）、ワイブトキシ（wybutosine）、プソイドウラシル、キューオシン、2-チオシトシン、5-メチル-2-チオウラシル、2-チオウラシル、4-チオウラシル、5-メチルウラシル、ウラシル-5-オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル-5-オキシ酢酸（v）、5-メチル-2-チオウラシル、3-（3-アミノ-3-N-2-カルボキシプロピル）ウラシル、（acp3）w、および2, 6-ジアミノプリンなどが挙げられるがそれらに限定されない。

#### 【0340】

本明細書において「RNAi」とは、RNA interferenceの略称で、二本鎖RNA（dsRNAともいう）のようなRNAiを引き起こす因子を細胞に導入することにより、相同なmRNAが特異的に分解され、遺伝子産物の合成が抑制される現象およびそれに用いられる技術をいう。本明細書においてRNAiはまた、場合によっては、RNAiを引き起こす因子と同義に用いられ得る。

#### 【0341】

本明細書において「RNAiを引き起こす因子」とは、RNAiを引き起こすことができるような任意の因子をいう。本明細書において「遺伝子」に対して「RNAiを引き起こす因子」とは、その遺伝子に関するRNAiを引き起こし、RNAiがもたらす効果（例えば、その遺伝子の発現抑制など）が達成されることをいう。そのようなRNAiを引き起こす因子としては、例えば、標的遺伝子の核酸配列の一部に対して少なくとも約70%の相同性を有する配列またはストリンジェントな条件下でハイブリダイズする配列を含む、少なくとも10ヌクレオチド長の二本鎖部分を含むRNAまたはその改変体が挙げられるがそれらに限定されない。ここで、この因子は、好ましくは、3' 突出末端を含み、より好ましくは、3' 突出末端は、2ヌクレオチド長以上のDNA（例えば、2~4ヌクレオチド長のDNA）であり得る。

#### 【0342】

理論に束縛されないが、RNAiが働く機構として考えられるものの一つとして、dsRNAのようなRNAiを引き起こす分子が細胞に導入されると、比較的長い(例えば、40塩基対以上)RNAの場合、ヘリカーゼドメインを持つダイサー(Dicer)と呼ばれるRNaseIII様のヌクレアーゼがATP存在下で、その分子を3'末端から約20塩基対ずつ切り出し、短鎖dsRNA(siRNAとも呼ばれる)を生じる。本明細書において「siRNA」とは、short interfering RNAの略称であり、人工的に化学合成されるかまたは生化学的に合成されたものか、あるいは生物体内で合成されたものか、あるいは約40塩基以上の二本鎖RNAが体内で分解されてできた10塩基対以上の短鎖二本鎖RNAをいい、通常、5'-リン酸、3'-OHの構造を有しており、3'末端は約2塩基突出している。このsiRNAに特異的なタンパク質が結合して、RISC(RNA-induced silencing complex)が形成される。この複合体は、siRNAと同じ配列を有するmRNAを認識して結合し、RNaseIII様の酵素活性によってsiRNAの中央部でmRNAを切断する。siRNAの配列と標的として切断するmRNAの配列の関係については、100%一致することが好ましい。しかし、siRNAの中央から外れた位置についての塩基の変異については、完全にRNAiによる切断活性がなくなるのではなく、部分的な活性が残存する。他方、siRNAの中央部の塩基の変異は影響が大きく、RNAiによるmRNAの切断活性が極度に低下する。このような性質を利用して、変異をもつmRNAについては、その変異を中央に配したsiRNAを合成し、細胞内に導入することで特異的に変異を含むmRNAだけを分解することができる。従って、本発明では、siRNAそのものをRNAiを引き起こす因子として用いることができるし、siRNAを生成するような因子(例えば、代表的に約40塩基以上のdsRNA)をそのような因子として用いることができる。

#### 【0343】

また、理論に束縛されることを希望しないが、siRNAは、上記経路とは別に、siRNAのアンチセンス鎖がmRNAに結合してRNA依存性RNAポリメラーゼ(RdRP)のプライマーとして作用し、dsRNAが合成され、このdsRNAが再びダイサーの基質となり、新たなsiRNAを生じて作用を増幅することも企図される。従って、本発明では、siRNA自体およびsiRNAが生じるような因子もまた、有用である。実際に、昆虫などでは、例えば35分子のdsRNA分子が、1,000コピー以上ある細胞内のmRNAをほぼ完全に分解することから、siRNA自体およびsiRNAが生じるような因子が有用であることが理解される。

#### 【0344】

本発明においてsiRNAと呼ばれる、約20塩基前後(例えば、代表的には約21~23塩基長)またはそれ未満の長さの二本鎖RNAを用いることができる。このようなsiRNAは、細胞に発現させることにより遺伝子発現を抑制し、そのsiRNAの標的となる病原遺伝子の発現を抑えることから、疾患の治療、予防、予後などに使用することができる。

#### 【0345】

本発明において用いられるsiRNAは、RNAiを引き起こすことができる限り、どのような形態を採っていてもよい。

#### 【0346】

別の実施形態において、本発明のRNAiを引き起こす因子は、3'末端に突出部を有する短いヘアピン構造(shRNA; short hairpin RNA)であり得る。本明細書において「shRNA」とは、一本鎖RNAで部分的に回文状の塩基配列を含むことにより、分子内で二本鎖構造をとり、ヘアピンのような構造となる約20塩基対以上の分子をいう。そのようなshRNAは、人工的に化学合成される。あるいは、そのようなshRNAは、センス鎖およびアンチセンス鎖のDNA配列を逆向きに連結したヘアピン構造のDNAをT7 RNAポリメラーゼによりインビトロでRNAを合成することによって生成することができる。理論に束縛されることは希望しないが、そのようなsh



RNAは、細胞内に導入された後、細胞内で約20塩基（代表的には例えば、21塩基、22塩基、23塩基）の長さに分解され、siRNAと同様にRNAiを引き起こし、本発明の処置効果があることが理解されるべきである。このような効果は、昆虫、植物、動物（哺乳動物を含む）など広汎な生物において発揮されることが理解されるべきである。このように、shRNAは、siRNAと同様にRNAiを引き起こすことから、本発明の有効成分として用いることができる。shRNAはまた、好ましくは、3' 突出末端を有し得る。二本鎖部分の長さは特に限定されないが、好ましくは約10ヌクレオチド長以上、より好ましくは約20ヌクレオチド長以上であり得る。ここで、3' 突出末端は、好ましくはDNAであり得、より好ましくは少なくとも2ヌクレオチド長以上のDNAであり得、さらに好ましくは2～4ヌクレオチド長のDNAであり得る。

#### 【0347】

本発明において用いられるRNAiを引き起こす因子は、人工的に合成した（例えば、化学的または生化学的）ものでも、天然に存在するものでも用いることができ、この両者の間で本発明の効果に本質的な違いは生じない。化学的に合成したものでは、液体クロマトグラフィーなどにより精製をすることが好ましい。

#### 【0348】

本発明において用いられるRNAiを引き起こす因子は、インビトロで合成することもできる。この合成系において、T7 RNAポリメラーゼおよびT7プロモーターを用いて、鋳型DNAからアンチセンスおよびセンスのRNAを合成する。これらをインビトロでアニリングした後、細胞に導入すると、上述のような機構を通じてRNAiが引き起こされ、本発明の効果が達成される。ここでは、例えば、リン酸カルシウム法でそのようなRNAを細胞内に導入することができる。

#### 【0349】

本発明のRNAiを引き起こす因子としてはまた、mRNAとハイブリダイズし得る一本鎖、あるいはそれらのすべての類似の核酸アナログのような因子も挙げられる。そのような因子もまた、本発明の処置方法および組成物において有用である。

#### 【0350】

本明細書において、「ストリンジェントな条件でハイブリダイズするポリヌクレオチド」とは、当該分野で慣用される周知の条件をいう。本発明のポリヌクレオチド中から選択されたポリヌクレオチドをプローブとして、コロニー・ハイブリダイゼーション法、ブランク・ハイブリダイゼーション法あるいはサザンブロットハイブリダイゼーション法等を用いることにより、そのようなポリヌクレオチドを得ることができる。具体的には、コロニーあるいはブランク由来のDNAを固定化したフィルターを用いて、0.7～1.0MのNaCl存在下、65℃でハイブリダイゼーションを行った後、0.1～2倍濃度のSSC (saline-sodium citrate) 溶液（1倍濃度のSSC溶液の組成は、150mM 塩化ナトリウム、15mM クエン酸ナトリウムである）を用い、65℃条件下でフィルターを洗浄することにより同定できるポリヌクレオチドを意味する。ハイブリダイゼーションは、Molecular Cloning 2nd ed., Current Protocols in Molecular Biology, Supplement 1～38、DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford University Press (1995) 等の実験書に記載されている方法に準じて行うことができる。ここで、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする配列からは、好ましくは、A配列のみまたはT配列のみを含む配列が除外される。「ハイブリダイズ可能なポリヌクレオチド」とは、上記ハイブリダイズ条件下で別のポリヌクレオチドにハイブリダイズすることができるポリヌクレオチドをいう。ハイブリダイズ可能なポリヌクレオチドとして具体的には、本発明で具体的に示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするDNAの塩基配列と少なくとも60%以上の相同性を有するポリヌクレオチド、好ましくは80%以上の相同性を有するポリヌクレオチド、さらに好ましくは95%以上の相同性を有するポリヌクレオチドを挙げることができる。

## 【0351】

本明細書において「高度にストリンジェントな条件」は、核酸配列において高度の相補性を有するDNA鎖のハイブリダイゼーションを可能にし、そしてミスマッチを有意に有するDNAのハイブリダイゼーションを除外するように設計された条件をいう。ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーは、主に、温度、イオン強度、およびホルムアミドのような変性剤の条件によって決定される。このようなハイブリダイゼーションおよび洗浄に関する「高度にストリンジェントな条件」の例は、0.0015M塩化ナトリウム、0.0015Mクエン酸ナトリウム、65～68℃、または0.015M塩化ナトリウム、0.0015Mクエン酸ナトリウム、および50%ホルムアミド、42℃である。このような高度にストリンジェントな条件については、Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第2版、Cold Spring Harbor Laboratory (Cold Spring Harbor, N. Y. 1989); およびAnderson et al., Nucleic Acid Hybridization: a Practical approach、IV、IRL Press Limited (Oxford, England). Limited, Oxford, Englandを参照のこと。必要により、よりストリンジェントな条件（例えば、より高い温度、より低いイオン強度、より高いホルムアミド、または他の変性剤）を、使用してもよい。他の薬剤が、非特異的なハイブリダイゼーションおよび/またはバックグラウンドのハイブリダイゼーションを減少する目的で、ハイブリダイゼーション緩衝液および洗浄緩衝液に含まれ得る。そのような他の薬剤の例としては、0.1%ウシ血清アルブミン、0.1%ポリビニルピロリドン、0.1%ピロリン酸ナトリウム、0.1%ドデシル硫酸ナトリウム (NaDodSO<sub>4</sub> またはSDS)、Ficoll、Denhardt溶液、超音波処理されたサケ精子DNA（または別の非相補的DNA）および硫酸デキストランであるが、他の適切な薬剤もまた、使用され得る。これらの添加物の濃度および型は、ハイブリダイゼーション条件のストリンジェンシーに実質的に影響を与えることなく変更され得る。ハイブリダイゼーション実験は、通常、pH 6.8～7.4で実施されるが；代表的なイオン強度条件において、ハイブリダイゼーションの速度は、ほとんどpH独立である。Anderson et al., Nucleic Acid Hybridization: a Practical Approach、第4章、IRL Press Limited (Oxford, England)を参照のこと。

## 【0352】

DNA二重鎖の安定性に影響を与える因子としては、塩基の組成、長さおよび塩基対不一致の程度が挙げられる。ハイブリダイゼーション条件は、当業者によって調整され得、これらの変数を適用させ、そして異なる配列関連性のDNAがハイブリッドを形成するのを可能にする。完全に一致したDNA二重鎖の融解温度は、以下の式によって概算され得る。

$$T_m (^{\circ}\text{C}) = 81.5 + 16.6 (\log [\text{Na}^+]) + 0.41 (\% \text{G+C}) - 600 / N - 0.72 (\% \text{ホルムアミド})$$

ここで、Nは、形成される二重鎖の長さであり、 $[\text{Na}^+]$  は、ハイブリダイゼーション溶液または洗浄溶液中のナトリウムイオンのモル濃度であり、%G+Cは、ハイブリッド中の（グアニン+シトシン）塩基のパーセンテージである。不完全に一致したハイブリッドに関して、融解温度は、各1%不一致（ミスマッチ）に対して約1℃ずつ減少する。

## 【0353】

本明細書において「中程度にストリンジェントな条件」とは、「高度にストリンジェントな条件」下で生じ得るよりも高い程度の塩基対不一致を有するDNA二重鎖が、形成し得る条件をいう。代表的な「中程度にストリンジェントな条件」の例は、0.015M塩化ナトリウム、0.0015Mクエン酸ナトリウム、50～65℃、または0.015M塩化ナトリウム、0.0015Mクエン酸ナトリウム、および20%ホルムアミド、37～50℃である。例として、0.015Mナトリウムイオン中、50℃の「中程度に

ストリンジェントな」条件は、約 21% の不一致を許容する。

【0354】

本明細書において「高度」にストリンジェントな条件と「中程度」にストリンジェントな条件との間に完全な区別は存在しないことがあり得ることが、当業者によって理解される。例えば、0.015M ナトリウムイオン（ホルムアミドなし）において、完全に一致した長い DNA の融解温度は、約 71℃ である。65℃（同じイオン強度）での洗浄において、これは、約 6% 不一致を許容にする。より離れた関連する配列を捕獲するために、当業者は、単に温度を低下させ得るか、またはイオン強度を上昇し得る。

【0355】

約 20 ヌクレオチドまでのオリゴヌクレオチドプローブについて、1M NaCl における融解温度の適切な概算は、  
 $T_m = (1 \text{ つの A-T 塩基につき } 2^\circ\text{C}) + (1 \text{ つの G-C 塩基対につき } 4^\circ\text{C})$   
によって提供される。なお、6×クエン酸ナトリウム塩（SSC）におけるナトリウムイオン濃度は、1M である（Suggs ら、Developmental Biology Using Purified Genes、683 頁、Brown および Fox（編）（1981）を参照のこと）。

【0356】

Pep5、PKC、p75、Rho GDI、MAG、p21、Rho、Rho キナーゼまたはその改変体もしくはフラグメントなどのタンパク質をコードする天然の核酸は、例えば、配列番号 1、3、5、7、9、11、13、16 または 18 などの核酸配列の一部またはその改変体を含む PCR プライマーおよびハイブリダイゼーションプローブを有する cDNA ライブラリーから容易に分離される。好ましい Pep5、PKC、p75、Rho GDI、MAG、p21、Rho、Rho キナーゼまたはその改変体もしくはフラグメントなどをコードする核酸は、本質的に 1% ウシ血清アルブミン（BSA）；500mM リン酸ナトリウム（NaPO<sub>4</sub>）；1mM EDTA；42℃ の温度で 7% SDS を含むハイブリダイゼーション緩衝液、および本質的に 2×SSC（600mM NaCl；60mM クエン酸ナトリウム）；50℃ の 0.1% SDS を含む洗浄緩衝液によって定義される低ストリンジェント条件下、さらに好ましくは本質的に 50℃ の温度での 1% ウシ血清アルブミン（BSA）；500mM リン酸ナトリウム（NaPO<sub>4</sub>）；15% ホルムアミド；1mM EDTA；7% SDS を含むハイブリダイゼーション緩衝液、および本質的に 50℃ の 1×SSC（300mM NaCl；30mM クエン酸ナトリウム）；1% SDS を含む洗浄緩衝液によって定義される低ストリンジェント条件下、最も好ましくは本質的に 50℃ の温度での 1% ウシ血清アルブミン（BSA）；200mM リン酸ナトリウム（NaPO<sub>4</sub>）；15% ホルムアミド；1mM EDTA；7% SDS を含むハイブリダイゼーション緩衝液、および本質的に 65℃ の 0.5×SSC（150mM NaCl；15mM クエン酸ナトリウム）；0.1% SDS を含む洗浄緩衝液によって定義される低ストリンジェント条件下に配列番号 1、3、5、7、9、11、13、16 または 18 に示す配列の 1 つまたはその一部とハイブリダイズし得る。

【0357】

本明細書において「プローブ」とは、インビトロおよび／またはインビボなどのスクリーニングなどの生物学的実験において用いられる、検索の対象となる物質をいい、例えば、特定の塩基配列を含む核酸分子または特定のアミノ酸配列を含むペプチドなどが挙げられるがそれに限定されない。

【0358】

通常プローブとして用いられる核酸分子としては、目的とする遺伝子の核酸配列と相同なまたは相補的な、少なくとも 8 の連続するヌクレオチド長の核酸配列を有するものが挙げられる。そのような核酸配列は、好ましくは、少なくとも 9 の連続するヌクレオチド長の、より好ましくは少なくとも 10 の連続するヌクレオチド長の、さらに好ましくは少なくとも 11 の連続するヌクレオチド長の、少なくとも 12 の連続するヌクレオチド長の、

少なくとも13の連続するヌクレオチド長の、少なくとも14の連続するヌクレオチド長の、少なくとも15の連続するヌクレオチド長の、少なくとも20の連続するヌクレオチド長の、少なくとも25の連続するヌクレオチド長の、少なくとも30の連続するヌクレオチド長の、少なくとも40の連続するヌクレオチド長の、少なくとも50の連続するヌクレオチド長の、少なくとも核酸配列であり得る。プローブとして使用される核酸配列には、上述の配列に対して、少なくとも70%相同な、より好ましくは、少なくとも80%相同な、さらに好ましくは、少なくとも90%相同な、少なくとも95%相同な核酸配列が含まれる。

#### 【0359】

本明細書において、「検索」とは、電子的にまたは生物学的あるいは他の方法により、ある核酸塩基配列を利用して、特定の機能および／または性質を有する他の核酸塩基配列を見出すことをいう。電子的な検索としては、BLAST (Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990))、FASTA (Pearson & Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 85:2444-2448 (1988))、Smith and Waterman法 (Smith and Waterman, J. Mol. Biol. 147:195-197 (1981))、およびNeedleman and Wunsch法 (Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443-453 (1970))などが挙げられるがそれらに限定されない。生物学的な検索としては、ストリンジェントハイブリダイゼーション、ゲノムDNAをナイロンメンブレン等に貼り付けたマイクロアレイまたはガラス板に貼り付けたマイクロアレイ (マイクロアレイアッセイ)、PCRおよびin situハイブリダイゼーションなどが挙げられるがそれらに限定されない。本明細書において、本発明において使用されるPep5、PKC、p75、RhogDI、MAG、p21、Rho、Rhoキナーゼなどには、このような電子的検索、生物学的検索によって同定された対応遺伝子も含まれるべきであることが意図される。

#### 【0360】

本明細書において配列 (アミノ酸または核酸など) の「同一性」、「相同性」および「類似性」のパーセンテージは、比較ウィンドウで最適な状態に整列された配列2つを比較することによって求められる。ここで、ポリヌクレオチド配列またはポリペプチド配列の比較ウィンドウ内の部分には、2つの配列の最適なアライメントについての基準配列 (他の配列に付加が含まれていればギャップが生じることもあるが、ここでの基準配列は付加も欠失もないものとする) と比較したときに、付加または欠失 (すなわちギャップ) が含まれる場合がある。同一の核酸塩基またはアミノ酸残基がどちらの配列にも認められる位置の数を求めることによって、マッチ位置の数を求め、マッチ位置の数を比較ウィンドウ内の総位置数で割り、得られた結果に100を掛けて同一性のパーセンテージを算出する。検索において使用される場合、相同性については、従来技術において周知のさまざまな配列比較アルゴリズムおよびプログラムの中から、適当なものをを用いて評価する。このようなアルゴリズムおよびプログラムとしては、TBLASTN、BLASTP、FASTA、TFASTAおよびCLUSTALW (Pearson and Lipman, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 (8):2444-2448, Altschul et al., 1990, J. Mol. Biol. 215 (3):403-410, Thompson et al., 1994, Nucleic Acids Res. 22 (2):4673-4680, Higgins et al., 1996, Methods Enzymol. 266:383-402, Altschul et al., 1990, J. Mol. Biol. 215 (3):403-410, Altschul et al., 1993, Nature Genetics 3:266-272) があげられるが、何らこれに限定されるものではない。特に好ましい実施形態では、従来技術において周知のBasic Local Alignment Search Tool (BLAST) (たとえば, Karlin and Altschul, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2267-22

68、Altschul et al., 1990, J. Mol. Biol. 215:403-410、Altschul et al., 1993, Nature Genetics 3:266-272、Altschul et al., 1997, Nuc. Acids Res. 25:3389-3402を参照のこと)を用いてタンパク質および核酸配列の相同性を評価する。特に、5つの専用BLASTプログラムを用いて以下の作業を実施することによって比較または検索が達成され得る。

【0361】

(1) BLASTPおよびBLAST3でアミノ酸のクエリー配列をタンパク質配列データベースと比較;

(2) BLASTNでヌクレオチドのクエリー配列をヌクレオチド配列データベースと比較;

(3) BLASTXでヌクレオチドのクエリー配列(両方の鎖)を6つの読み枠で変換した概念的翻訳産物をタンパク質配列データベースと比較;

(4) TBLASTNでタンパク質のクエリー配列を6つの読み枠(両方の鎖)すべてで変換したヌクレオチド配列データベースと比較;

(5) TBLASTXでヌクレオチドのクエリー配列を6つの読み枠で変換したものを、6つの読み枠で変換したヌクレオチド配列データベースと比較。

【0362】

BLASTプログラムは、アミノ酸のクエリー配列または核酸のクエリー配列と、好ましくはタンパク質配列データベースまたは核酸配列データベースから得られた被検配列との間で、「ハイスコアセグメント対」と呼ばれる類似のセグメントを特定することによって相同配列を同定するものである。ハイスコアセグメント対は、多くのものが従来技術において周知のスコアリングマトリックスによって同定(すなわち整列化)されると好ましい。好ましくは、スコアリングマトリックスとしてBLOSUM62マトリックス(Gonnet et al., 1992, Science 256:1443-1445、Henikoff and Henikoff, 1993, Proteins 17:49-61)を使用する。このマトリックスほど好ましいものではないが、PAMまたはPAM250マトリックスも使用できる(たとえば、Schwartz and Dayhoff, eds., 1978, Matrices for Detecting Distance Relationships: Atlas of Protein Sequence and Structure, Washington: National Biomedical Research Foundationを参照のこと)。BLASTプログラムは、同定されたすべてのハイスコアセグメント対の統計的な有意性を評価し、好ましくはユーザー固有の相同率などのユーザーが独自に定める有意性の閾値レベルを満たすセグメントを選択する。統計的な有意性を求めるKarlinの式を用いてハイスコアセグメント対の統計的な有意性を評価すると好ましい(Karlin and Altschul, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2267-2268参照のこと)。

【0363】

本明細書における「プライマー」とは、高分子合成酵素反応において、合成される高分子化合物の反応の開始に必要な物質をいう。核酸分子の合成反応では、合成されるべき高分子化合物の一部の配列に相補的な核酸分子(例えば、DNAまたはRNAなど)が用いられ得る。

【0364】

通常プライマーとして用いられる核酸分子としては、目的とする遺伝子の核酸配列と相補的な、少なくとも8の連続するヌクレオチド長の核酸配列を有するものが挙げられる。そのような核酸配列は、好ましくは、少なくとも9の連続するヌクレオチド長の、より好ましくは少なくとも10の連続するヌクレオチド長の、さらに好ましくは少なくとも11の連続するヌクレオチド長の、少なくとも12の連続するヌクレオチド長の、少なくとも13の連続するヌクレオチド長の、少なくとも14の連続するヌクレオチド長の、少なく

とも15の連続するヌクレオチド長の、少なくとも16の連続するヌクレオチド長の、少なくとも17の連続するヌクレオチド長の、少なくとも18の連続するヌクレオチド長の、少なくとも19の連続するヌクレオチド長の、少なくとも20の連続するヌクレオチド長の、少なくとも25の連続するヌクレオチド長の、少なくとも30の連続するヌクレオチド長の、少なくとも40の連続するヌクレオチド長の、少なくとも50の連続するヌクレオチド長の、核酸配列であり得る。プローブとして使用される核酸配列には、上述の配列に対して、少なくとも70%相同な、より好ましくは、少なくとも80%相同な、さらに好ましくは、少なくとも90%相同な、少なくとも95%相同な核酸配列が含まれる。プライマーとして適切な配列は、合成（増幅）が意図される配列の性質によって変動し得るが、当業者は、意図される配列に応じて適宜プライマーを設計することができる。そのようなプライマーの設計は当該分野において周知であり、手動でおこなってもよくコンピュータプログラム（例えば、LASERGENE, Primer Select, DNASTar）を用いて行ってもよい。

#### 【0365】

本明細書において、「エピトープ」とは、構造の明らかな抗原決定基をいう。従って、エピトープには特定の免疫グロブリンによる認識に関与するアミノ酸残基のセット、または、T細胞の場合は、T細胞レセプタータンパク質および／もしくは主要組織適合性複合体（MHC）レセプターによる認識について必要であるアミノ酸残基のセットが包含される。この用語はまた、「抗原決定基」または「抗原決定部位」と交換可能に使用される。免疫系分野において、インビボまたはインビトロで、エピトープは、分子の特徴（例えば、一次ペプチド構造、二次ペプチド構造または三次ペプチド構造および電荷）であり、免疫グロブリン、T細胞レセプターまたはHLA分子によって認識される部位を形成する。ペプチドを含むエピトープは、エピトープに独特な空間的コンフォメーション中に3つ以上のアミノ酸を含み得る。一般に、エピトープは、少なくとも5つのこのようなアミノ酸からなり、代表的には少なくとも6つ、7つ、8つ、9つ、または10のこのようなアミノ酸からなる。エピトープの長さは、より長いほど、もとのペプチドの抗原性に類似することから一般的に好ましいが、コンフォメーションを考慮すると、必ずしもそうでないことがある。アミノ酸の空間的コンフォメーションを決定する方法は、当該分野で公知であり、例えば、X線結晶学、および2次元核磁気共鳴分光法を含む。さらに、所定のタンパク質におけるエピトープの同定は、当該分野で周知の技術を使用して容易に達成される。例えば、Geysenら（1984）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3998（所定の抗原における免疫原性エピトープの位置を決定するために迅速にペプチドを合成する一般的な方法）；米国特許第4,708,871号（抗原のエピトープを同定し、そして化学的に合成するための手順）；およびGeysenら（1986）Molecular Immunology 23:709（所定の抗体に対して高い親和性を有するペプチドを同定するための技術）を参照されたい。同じエピトープを認識する抗体は、単純な免疫アッセイにおいて同定され得る。このように、ペプチドを含むエピトープを決定する方法は、当該分野において周知であり、そのようなエピトープは、核酸またはアミノ酸の一次配列が提供されると、当業者はそのような周知慣用技術を用いて決定することができる。

#### 【0366】

従って、ペプチドを含むエピトープとして使用するためには、少なくとも3アミノ酸の長さの配列が必要であり、好ましくは、この配列は、少なくとも4アミノ酸、より好ましくは少なくとも5アミノ酸、少なくとも6アミノ酸、少なくとも7アミノ酸、少なくとも8アミノ酸、少なくとも9アミノ酸、少なくとも10アミノ酸、少なくとも15アミノ酸、少なくとも20アミノ酸、少なくとも25アミノ酸の長さの配列が必要であり得る。エピトープは線状であってもコンフォメーション形態であってもよい。

#### 【0367】

（遺伝子、タンパク質分子、核酸分子などの改変）

あるタンパク質分子（例えば、Pep5、PKC、p75、Rho GDI、MAG、

p21、Rho、Rhoキナーゼなど)において、配列に含まれるあるアミノ酸は、相互作用結合能力の明らかな低下または消失なしに、例えば、カチオン性領域または基質分子の結合部位のようなタンパク質構造において他のアミノ酸に置換され得る。あるタンパク質の生物学的機能を規定するのは、タンパク質の相互作用能力および性質である。従って、特定のアミノ酸の置換がアミノ酸配列において、またはそのDNAコード配列のレベルにおいて行われ得、置換後もなお、もとの性質を維持するタンパク質が生じ得る。従って、生物学的有用性の明らかな損失なしに、種々の改変が、本明細書において開示されたペプチドまたはこのペプチドをコードする対応するDNAにおいて行われ得る。

#### 【0368】

上記のような改変を設計する際に、アミノ酸の疎水性指数が考慮され得る。タンパク質における相互作用的な生物学的機能を与える際の疎水性アミノ酸指数の重要性は、一般に当該分野で認められている(Kyte, JおよびDoolittle, R. F. J. Mol. Biol. 157 (1): 105-132, 1982)。アミノ酸の疎水的性質は、生成したタンパク質の二次構造に寄与し、次いでそのタンパク質と他の分子(例えば、酵素、基質、レセプター、DNA、抗体、抗原など)との相互作用を規定する。各アミノ酸は、それらの疎水性および電荷の性質に基づく疎水性指数を割り当てられる。それらは: イソロイシン(+4.5); バリン(+4.2); ロイシン(+3.8); フェニルアラニン(+2.8); システイン/シスチン(+2.5); メチオニン(+1.9); アラニン(+1.8); グリシン(-0.4); スレオニン(-0.7); セリン(-0.8); トリプトファン(-0.9); チロシン(-1.3); プロリン(-1.6); ヒスチジン(-3.2); グルタミン酸(-3.5); グルタミン(-3.5); アスパラギン酸(-3.5); アスパラギン(-3.5); リジン(-3.9); およびアルギニン(-4.5)である。

#### 【0369】

あるアミノ酸を、同様の疎水性指数を有する他のアミノ酸により置換して、そして依然として同様の生物学的機能を有するタンパク質(例えば、酵素活性において等価なタンパク質)を生じさせ得ることが当該分野で周知である。このようなアミノ酸置換において、疎水性指数が±2以内であることが好ましく、±1以内であることがより好ましく、および±0.5以内であることがさらに好ましい。疎水性に基づくこのようなアミノ酸の置換は効率的であることが当該分野において理解される。

#### 【0370】

当該分野において、親水性指数もまた、改変設計において考慮され得る。米国特許第4,554,101号に記載されるように、以下の親水性指数がアミノ酸残基に割り当てられている: アルギニン(+3.0); リジン(+3.0); アスパラギン酸(+3.0±1); グルタミン酸(+3.0±1); セリン(+0.3); アスパラギン(+0.2); グルタミン(+0.2); グリシン(0); スレオニン(-0.4); プロリン(-0.5±1); アラニン(-0.5); ヒスチジン(-0.5); システイン(-1.0); メチオニン(-1.3); バリン(-1.5); ロイシン(-1.8); イソロイシン(-1.8); チロシン(-2.3); フェニルアラニン(-2.5); およびトリプトファン(-3.4)。アミノ酸が同様の親水性指数を有しかつ依然として生物学的等価体を与え得る別のものに置換され得ることが理解される。このようなアミノ酸置換において、親水性指数が±2以内であることが好ましく、±1以内であることがより好ましく、および±0.5以内であることがさらに好ましい。

#### 【0371】

本明細書において、「保存的置換」とは、アミノ酸置換において、元のアミノ酸と置換されるアミノ酸との親水性指数または/および疎水性指数が上記のように類似している置換をいう。保存的置換の例としては、例えば、親水性指数または疎水性指数が、±2以内のもの同士、好ましくは±1以内のもの同士、より好ましくは±0.5以内のもの同士のものが挙げられるがそれらに限定されない。従って、保存的置換の例は、当業者に周知であり、例えば、次の各グループ内での置換: アルギニンおよびリジン; グルタミン酸および

びアスパラギン酸；セリンおよびスレオニン；グルタミンおよびアスパラギン；ならびにバリン、ロイシン、およびイソロイシン、などが挙げられるがこれらに限定されない。

#### 【0372】

本明細書において、「改変体」とは、もとのポリペプチドまたはポリヌクレオチドなどの物質に対して、一部が変更されているものをいう。そのような改変体としては、置換改変体、付加改変体、欠失改変体、短縮 (truncated) 改変体、対立遺伝子変異体などが挙げられる。そのような改変体としては、基準となる核酸分子またはポリペプチドに対して、1または数個の置換、付加および/または欠失、あるいは1つ以上の置換、付加および/または欠失を含むものが挙げられるがこれらに限定されない。対立遺伝子 (allele) とは、同一遺伝子座に属し、互いに区別される遺伝的改変体のことをいう。従って、「対立遺伝子変異体」とは、ある遺伝子に対して、対立遺伝子の関係にある改変体をいう。そのような対立遺伝子変異体は、通常その対応する対立遺伝子と同一または非常に類似性の高い配列を有し、通常はほぼ同一の生物学的活性を有するが、まれに異なる生物学的活性を有することもある。「種相同体またはホモログ (homolog)」とは、ある種の中で、ある遺伝子とアミノ酸レベルまたはヌクレオチドレベルで、相同性 (好ましくは、60%以上の相同性、より好ましくは、80%以上、85%以上、90%以上、95%以上の相同性) を有するものをいう。そのような種相同体を取得する方法は、本明細書の記載から明らかである。「オルソログ (ortholog)」とは、オルソログス遺伝子 (orthologous gene) ともいい、二つの遺伝子がある共通祖先からの種分化に由来する遺伝子をいう。例えば、多重遺伝子構造をもつヘモグロビン遺伝子ファミリーを例にとると、ヒトおよびマウスの $\alpha$ ヘモグロビン遺伝子はオルソログであるが、ヒトの $\alpha$ ヘモグロビン遺伝子および $\beta$ ヘモグロビン遺伝子はパラログ (遺伝子重複で生じた遺伝子) である。オルソログは、分子系統樹の推定に有用である。オルソログは、通常別の種において、もとの種と同様の機能を果たしていることがあり得ることから、本発明のオルソログもまた、本発明において有用であり得る。

#### 【0373】

本明細書において「保存的 (に改変された) 改変体」は、アミノ酸配列および核酸配列の両方に適用される。特定の核酸配列に関して、保存的に改変された改変体とは、同一のまたは本質的に同一のアミノ酸配列をコードする核酸をいい、核酸がアミノ酸配列をコードしない場合には、本質的に同一な配列をいう。遺伝コードの縮重のため、多数の機能的に同一な核酸が任意の所定のタンパク質をコードする。例えば、コドンGCA、GCC、GCG、およびGCUはすべて、アミノ酸アラニンをコードする。したがって、アラニンがコドンにより特定される全ての位置で、そのコドンは、コードされたポリペプチドを変更することなく、記載された対応するコドンの任意のものに変更され得る。このような核酸の変動は、保存的に改変された変異の1つの種である「サイレント改変 (変異)」である。ポリペプチドをコードする本明細書中のすべての核酸配列はまた、その核酸の可能なすべてのサイレント変異を記載する。当該分野において、核酸中の各コドン (通常メチオニンのための唯一のコドンであるAUG、および通常トリプトファンのための唯一のコドンであるTGGを除く) が、機能的に同一な分子を産生するために改変され得ることが理解される。したがって、ポリペプチドをコードする核酸の各サイレント変異は、記載された各配列において暗黙に含まれる。好ましくは、そのような改変は、ポリペプチドの高次構造に多大な影響を与えるアミノ酸であるシステインの置換を回避するようになされ得る。このような塩基配列の改変法としては、制限酵素などによる切断、DNAポリメラーゼ、Klenowフラグメント、DNAリガーゼなどによる処理等による連結等の処理、合成オリゴヌクレオチドなどを用いた部位特異的塩基置換法 (特定部位指向突然変異法; Mark Zoller and Michael Smith, *Methods in Enzymology*, 100, 468-500 (1983)) が挙げられるが、この他にも通常分子生物学の分野で用いられる方法によって改変を行うこともできる。

#### 【0374】

本明細書中において、機能的に等価なポリペプチドを作製するために、アミノ酸の置換



のほかに、アミノ酸の付加、欠失、または修飾もまた行うことができる。アミノ酸の置換とは、もとのペプチドを1つ以上、例えば、1～10個、好ましくは1～5個、より好ましくは1～3個のアミノ酸で置換することをいう。アミノ酸の付加とは、もとのペプチド鎖に1つ以上、例えば、1～10個、好ましくは1～5個、より好ましくは1～3個のアミノ酸を付加することをいう。アミノ酸の欠失とは、もとのペプチドから1つ以上、例えば、1～10個、好ましくは1～5個、より好ましくは1～3個のアミノ酸を欠失させることをいう。アミノ酸修飾は、アミド化、カルボキシル化、硫酸化、ハロゲン化、短縮化、脂質化 (lipidation)、ホスホリル化、アルキル化、グリコシル化、リン酸化、水酸化、アシル化 (例えば、アセチル化) などを含むが、これらに限定されない。置換、または付加されるアミノ酸は、天然のアミノ酸であってもよく、非天然のアミノ酸、またはアミノ酸アナログでもよい。天然のアミノ酸が好ましい。

#### 【0375】

本明細書において使用される用語「ペプチドアナログ」または「ペプチド誘導体」とは、ペプチドとは異なる化合物であるが、ペプチドと少なくとも1つの化学的機能または生物学的機能が等価であるものをいう。したがって、ペプチドアナログには、もとのペプチドに対して、1つ以上のアミノ酸アナログまたはアミノ酸誘導体が付加または置換されているものが含まれる。ペプチドアナログは、その機能が、もとのペプチドの機能 (例えば、pKa値が類似していること、官能基が類似していること、他の分子との結合様式が類似していること、水溶性が類似していることなど) と実質的に同様であるように、このような付加または置換がされている。そのようなペプチドアナログは、当該分野において周知の技術を用いて作製することができる。したがって、ペプチドアナログは、アミノ酸アナログを含むポリマーであり得る。

#### 【0376】

本発明のポリペプチドがポリマーに結合している、化学修飾されたポリペプチド組成物は、本発明の範囲に包含される。このポリマーは、水溶性であり得、水溶性環境 (例えば、生理学的環境) でこのタンパク質の沈澱を防止し得る。適切な水性ポリマーは、例えば、以下からなる群より選択され得る: ポリエチレングリコール (PEG)、モノメトキシポリエチレングリコール、デキストラン、セルロース、または他の炭水化物に基づくポリマー、ポリ (N-ビニルピロリドン) ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコールホモポリマー、ポリプロピレンオキシド/エチレンオキシドコポリマー、ポリオキシエチル化ポリオール (例えば、グリセロール) およびポリビニルアルコール。この選択されたポリマーは、通常は改変され、単一の反応性基 (例えば、アシル化のための活性エステルまたはアルキル化のためのアルデヒド) を有し、その結果、重合度は制御され得る。ポリマーは、任意の分子量であり得、そして、このポリマーは分枝状でも分枝状でなくともよく、そしてこのようなポリマーの混合物はまた、使用され得る。この化学修飾された本発明のポリマーは、治療用途に決定付けられる場合、薬学的に受容可能なポリマーが使用するために選択される。

#### 【0377】

このポリマーがアシル化反応によって改変される場合、このポリマーは、単一の反応性エステル基を有するべきである。あるいは、このポリマーが還元アルキル化によって改変される場合、このポリマーは単一の反応性アルデヒド基を有するべきである。好ましい反応性アルデヒドは、ポリエチレングリコール、プロピオンアルデヒド (このプロピオンアルデヒドは、水溶性である) または、そのモノC1～C10の、アルコキシ誘導体もしくはアリールオキシ誘導体である (例えば、米国特許第5, 252, 714号 (これは、本明細書中で全体が参考として援用される) を参照のこと)。

#### 【0378】

本発明のポリペプチドのペグ化 (pegylation) は、例えば、以下の参考文献に記載されるような、当該分野で公知の、任意のペグ化反応によって実施され得る: F o c u s o n G r o w t h F a c t o r s 3, 4-10 (1992); EP 0 154 316 ; および EP 0 401 384 (これらの各々は、本明細書中で、

全体が参考として援用される)。好ましくは、このペグ化は、反応性ポリエチレングリコール分子（または、類似の反応性水溶性ポリマー）とのアシル化反応またはアルキル化反応を介して実施される。本発明のポリペプチド（例えば、MAG、p75、p21、Pepp5、Rho、Rho GDI など）のペグ化のための好ましい水溶性ポリマーは、ポリエチレングリコール（PEG）である。本明細書中で使用される場合、「ポリエチレングリコール」は、PEGの任意の形態の包含することを意味し、ここで、このPEGは、他のタンパク質（例えば、モノ（C1～C10）アルコキシポリエチレングリコールまたはモノ（C1～C10）アリアルコキシポリエチレングリコール）を誘導体するために使用される。

#### 【0379】

本発明のポリペプチドの化学誘導体化を、生物学的に活性な物質を活性化したポリマー分子と反応させるのに使用される適切な条件下で、実施され得る。ペグ化した本発明のポリペプチドを調製するための方法は、一般に以下の工程を包含する：（a）p75シグナル伝達経路における伝達因子が1以上のPEG基に結合するような条件下で、ポリエチレングリコール（例えば、PEGの、反応性エステルまたはアルデヒド誘導体）とこのポリペプチドを反応させる工程および（b）この反応生成物を得る工程。公知のパラメータおよび所望の結果に基づいて、最適な反応条件またはアシル化反応を選択することは当業者に容易である。

#### 【0380】

ペグ化された本発明のポリペプチドは、一般に、本明細書中に記載のポリペプチドを投与することによって、緩和または調節され得る状態を処置するために使用され得るが、しかし、本明細書中で開示された、化学誘導体化された本発明のポリペプチド分子は、それらの非誘導体分子と比較して、さらなる活性、増大された生物活性もしくは減少した生物活性、または他の特徴（例えば、増大された半減期または減少した半減期）を有し得る。本発明のポリペプチド、それらのフラグメント、改変体および誘導体は、単独で、併用して、または他の薬学的組成物を組み合わせて使用され得る。これらのサイトカイン、増殖因子、抗原、抗炎症剤および／または化学療法剤は、徴候を処置するのに適切である。

#### 【0381】

同様に、「ポリヌクレオチドアナログ」、「核酸アナログ」は、ポリヌクレオチドまたは核酸とは異なる化合物であるが、ポリヌクレオチドまたは核酸と少なくとも1つの化学的機能または生物学的機能が等価であるものをいう。したがって、ポリヌクレオチドアナログまたは核酸アナログには、もとのペプチドに対して、1つ以上のヌクレオチドアナログまたはヌクレオチド誘導体が付加または置換されているものが含まれる。

#### 【0382】

本明細書において使用される核酸分子は、発現されるポリペプチドが天然型のポリペプチドと実質的に同一の活性を有する限り、上述のようにその核酸の配列の一部が欠失または他の塩基により置換されていてもよく、あるいは他の核酸配列が一部挿入されていてもよい。あるいは、5'末端および／または3'末端に他の核酸が結合していてもよい。また、ポリペプチドをコードする遺伝子をストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、そのポリペプチドと実質的に同一の機能を有するポリペプチドをコードする核酸分子でもよい。このような遺伝子は、当該分野において公知であり、本発明において利用することができる。

#### 【0383】

このような核酸は、周知のPCR法により得ることができ、化学的に合成することもできる。これらの方法に、例えば、部位特異的変位誘発法、ハイブリダイゼーション法などを組み合わせてもよい。

#### 【0384】

本明細書において、ポリペプチドまたはポリヌクレオチドの「置換、付加または欠失」とは、もとのポリペプチドまたはポリヌクレオチドに対して、それぞれアミノ酸もしくはその代替物、またはヌクレオチドもしくはその代替物が、置き換わること、付け加わるこ

とまたは取り除かれることをいう。このような置換、付加または欠失の技術は、当該分野において周知であり、そのような技術の例としては、部位特異的変異誘発技術などが挙げられる。置換、付加または欠失は、1つ以上であれば任意の数でよく、そのような数は、その置換、付加または欠失を有する改変体において目的とする機能（例えば、ホルモン、サイトカインの情報伝達機能など）が保持される限り、多くすることができる。例えば、そのような数は、1または数個であり得、そして好ましくは、全体の長さの20%以内、10%以内、または100個以下、50個以下、25個以下などであり得る。

#### 【0385】

(一般技術)

本明細書において用いられる分子生物学的手法、生化学的手法、微生物学的手法は、当該分野において周知であり慣用されるものであり、例えば、Sambrook J. et al. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harborおよびその3rd Ed. (2001); Ausubel, F. M. (1987). *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience; Ausubel, F. M. (1989). *Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience; Innis, M. A. (1990). *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Academic Press; Ausubel, F. M. (1992). *Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Pub. Associates; Ausubel, F. M. (1995). *Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Pub. Associates; Innis, M. A. et al. (1995). *PCR Strategies*, Academic Press; Ausubel, F. M. (1999). *Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley, and annual updates; Sninsky, J. J. et al. (1999). *PCR Applications: Protocols for Functional Genomics*, Academic Press、別冊実験医学「遺伝子導入&発現解析実験法」羊土社、1997などに記載されており、これらは本明細書において関連する部分（全部であり得る）が参考として援用される。

#### 【0386】

人工的に合成した遺伝子を作製するためのDNA合成技術および核酸化学については、例えば、Gait, M. J. (1985). *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach*, IRL Press; Gait, M. J. (1990). *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach*, IRL Press; Eckstein, F. (1991). *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach*, IRL Press; Adams, R. L. et al. (1992). *The Biochemistry of the Nucleic Acids*, Chapman & Hall; Shabarova, Z. et al. (1994). *Advanced Organic Chemistry of Nucl*

eic Acids, Weinheim; Blackburn, G. M. et al. (1996). Nucleic Acids in Chemistry and Biology, Oxford University Press; Hermanson, G. T. (1996). Bioconjugate Techniques, Academic Pressなどに記載されており、これらは本明細書において関連する部分が参考として援用される。

#### 【0387】

(遺伝子工学)

本発明において用いられるPep5、PKC、p75、Rho GDI、MAG、p21、Rho、Rhoキナーゼなどならびにそのフラグメントおよび改変体は、遺伝子工学技術を用いて生産することができる。

#### 【0388】

本明細書において遺伝子について言及する場合、「ベクター」または「組み換えベクター」とは、目的のポリヌクレオチド配列を目的の細胞へと移入させることができるベクターをいう。そのようなベクターとしては、原核細胞、酵母、動物細胞、植物細胞、昆虫細胞、動物個体および植物個体などの宿主細胞において自立複製が可能、または染色体中への組み込みが可能で、本発明のポリヌクレオチドの転写に適した位置にプロモーターを含有しているものが例示される。ベクターのうち、クローニングに適したベクターを「クローニングベクター」という。そのようなクローニングベクターは通常、制限酵素部位を複数含むマルチプルクローニング部位を含む。そのような制限酵素部位およびマルチプルクローニング部位は、当該分野において周知であり、当業者は、目的に合わせて適宜選択して使用することができる。そのような技術は、本明細書に記載される文献(例えば、Sambrookら、前出)に記載されている。好ましいベクターとしては、プラスミド、ファージ、コスミド、エピソーム、ウイルス粒子またはウイルスおよび組み込み可能なDNAフラグメント(すなわち、相同組換えによって宿主ゲノム中に組み込み可能なフラグメント)が挙げられるが、これらに限定されない。好ましいウイルス粒子としては、アデノウイルス、バキュロウイルス、パルボウイルス、ヘルペスウイルス、ボックスウイルス、アデノ随伴ウイルス、セムリキ森林ウイルス、ワクシニアウイルスおよびレトロウイルスが挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0389】

ベクターの1つの型は、「プラスミド」であり、これは、さらなるDNAセグメントが連結され得る環状二重鎖DNAループをいう。別の型のベクターは、ウイルスベクターであり、ここで、さらなるDNAセグメントは、ウイルスゲノム中に連結され得る。特定のベクター(例えば、細菌の複製起点を有する細菌ベクターおよびエピソーム哺乳動物ベクター)は、これらが導入される宿主細胞中で自律的に複製し得る。他のベクター(例えば、非エピソーム哺乳動物ベクター)は、宿主細胞中への導入の際に宿主細胞のゲノム中に組み込まれ、それにより、宿主ゲノムと共に複製される。さらに、特定のベクターは、これらが作動可能に連結される遺伝子の発現を指向し得る。このようなベクターは、本明細書中で、「発現ベクター」といわれる。

#### 【0390】

従って、本明細書において「発現ベクター」とは、構造遺伝子およびその発現を調節するプロモーターに加えて種々の調節エレメントが宿主の細胞中で作動し得る状態で連結されている核酸配列をいう。調節エレメントは、好ましくは、ターミネーター、薬剤耐性遺伝子のような選択マーカーおよび、エンハンサーを含み得る。生物(例えば、動物)の発現ベクターのタイプおよび使用される調節エレメントの種類が、宿主細胞に応じて変わり得ることは、当業者に周知の事項である。

#### 【0391】

本発明において用いられ得る原核細胞に対する「組み換えベクター」としては、p cDNA3(+)、p Bluescript-SK(+/-)、p GEM-T、p EF-BO S、p EGFP、p HAT、p UC18、p FT-DEST<sup>TM</sup> 42 GATEWAY (I

n v i t r o g e n) などが例示される。

【0392】

本発明において用いられ得る動物細胞に対する「組み換えベクター」としては、p c D N A I / A m p、p c D N A I、p C D M 8 (いずれもフナコシより市販)、p A G E 1 0 7 [特開平3-229 (I n v i t r o g e n)、p A G E 1 0 3 [J. B i o c h e m. , 1 0 1, 1 3 0 7 (1987)]、p A M o、p A M o A [J. B i o l. C h e m. , 2 6 8, 2 2 7 8 2-2 2 7 8 7 (1993)]、マウス幹細胞ウイルス (M u r i n e S t e m C e l l V i r u s) (M S C V) に基づいたレトロウイルス型発現ベクター、p E F - B O S、p E G F P などが例示される。

【0393】

本明細書において「ターミネーター」は、遺伝子のタンパク質をコードする領域の下流に位置し、DNAがmRNAに転写される際の転写の終結、ポリA配列の付加に参与する配列である。ターミネーターは、mRNAの安定性に参与して遺伝子の発現量に影響を及ぼすことが知られている。

【0394】

本明細書において「プロモーター」とは、遺伝子の転写の開始部位を決定し、またその頻度を直接的に調節するDNA上の領域をいい、通常RNAポリメラーゼが結合して転写を始める塩基配列である。したがって、本明細書においてある遺伝子のプロモーターの働きを有する部分を「プロモーター部分」という。プロモーターの領域は、通常、推定タンパク質コード領域の第1エキソンの上流約2 k b p 以内の領域であることが多いので、DNA解析用ソフトウェアを用いてゲノム塩基配列中のタンパク質コード領域を予測すれば、プロモーター領域を推定することはできる。推定プロモーター領域は、構造遺伝子ごとに変動するが、通常構造遺伝子上流にあるが、これらに限定されず、構造遺伝子の下流にもあり得る。好ましくは、推定プロモーター領域は、第一エキソン翻訳開始点から上流約2 k b p 以内に存在する。

【0395】

本明細書において「複製起点」とは、DNA複製が開始する染色体上の特定領域をいう。複製起点は、内因性起点を含むようにそのベクターを構築することによって提供され得るか、または宿主細胞の染色体複製機構により提供され得るかのいずれかであり得る。そのベクターが、宿主細胞染色体中に組み込まれる場合、後者が十分であり得る。あるいは、ウイルス複製起点を含むベクターを使用するよりも、当業者は、選択マーカーと本発明のDNAとを同時形質転換する方法によって、哺乳動物細胞を形質転換し得る。適切な選択マーカーの例は、ジヒドロ葉酸還元酵素 (D H F R) またはチミジンキナーゼである (米国特許第4, 399, 216号を参照)。

【0396】

例えば、組織特異的調節エレメントを使用して核酸を発現することによって、組換え哺乳動物発現ベクターでは、特定の細胞型において核酸の発現を優先的に指向し得る。組織特異的調節エレメントは、当該分野で公知である。適切な組織特異的プロモーターの非限定的な例としては、発生的に調節されたプロモーター (例えば、マウス h o x プロモーター (K e s s e l および G r u s s (1990) S c i e n c e 249, 374-379) および  $\alpha$ -フェトプロテインプロモーター (C a m p e s および T i l g h m a n (1989) G e n e s D e v. 3, 537-546))、アルブミンプロモーター (肝臓特異的; P i n k e r t ら (1987) G e n e s D e v. 1, 268-277)、リンパ特異的プロモーター (C a l a m e および E a t o n (1988) A d v. I m m u n o l. 43, 235-275)、特にT細胞レセプター (W i n o t o および B a l t i m o r e (1989) E M B O J. 8, 729-733) および免疫グロブリン (B a n e r j i ら (1983) C e l l 33, 729-740; Q u e e n および B a l t i m o r e (1983) C e l l 33, 741-748) のプロモーター、ニューロン特異的プロモーター (例えば、神経線維プロモーター; B y r n e および R u d d l e (1989) P r o c. N a t l. A c a d. S c i. U S A 86, 5473-54

77)、脾臓特異的プロモーター (Edlundら (1985) Science 230, 912-916)、および乳腺特異的プロモーター (例えば、乳清プロモーター; 米国特許第4, 873, 316号および欧州出願公開番号264, 166) が挙げられるがそれらに限定されない。

#### 【0397】

本明細書において「エンハンサー」とは、目的遺伝子の発現効率を高めるために用いられる配列をいう。そのようなエンハンサーは当該分野において周知である。エンハンサーは複数個用いられ得るが1個用いられてもよいし、用いなくともよい。

#### 【0398】

本明細書において「作動可能に連結された(る)」とは、所望の配列の発現(作動)がある転写翻訳調節配列(例えば、プロモーター、エンハンサーなど)または翻訳調節配列の制御下に配置されることをいう。プロモーターが遺伝子に作動可能に連結されるためには、通常、その遺伝子のすぐ上流にプロモーターが配置されるが、必ずしも隣接して配置される必要はない。

#### 【0399】

本明細書において、核酸分子を細胞に導入する技術は、どのような技術でもよく、例えば、形質転換、形質導入、トランスフェクションなどが挙げられる。そのような核酸分子の導入技術は、当該分野において周知であり、かつ、慣用されるものであり、例えば、Ausubel F. A. ら編(1988)、Current Protocols in Molecular Biology, Wiley, New York, NY; Sambrook Jら(1987) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed. およびその第三版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY、別冊実験医学「遺伝子導入&発現解析実験法」羊土社、1997などに記載される。遺伝子の導入は、ノーザンブロット、ウェスタンブロット分析のような本明細書に記載される方法または他の周知慣用技術を用いて確認することができる。

#### 【0400】

また、ベクターの導入方法としては、細胞にDNAを導入する上述のような方法であればいずれも用いることができ、例えば、トランスフェクション、形質導入、形質転換など(例えば、リン酸カルシウム法、リポソーム法、DEAEデキストラン法、エレクトロポレーション法、パーティクルガン(遺伝子銃)を用いる方法など)が挙げられる。

#### 【0401】

本明細書において「形質転換体」とは、形質転換によって作製された細胞などの生命体の全部または一部をいう。形質転換体としては、原核細胞、酵母、動物細胞、植物細胞、昆虫細胞などが例示される。形質転換体は、その対象に依存して、形質転換細胞、形質転換組織、形質転換宿主などともいわれる。本発明において用いられる細胞は、形質転換体であってもよい。

#### 【0402】

本発明において遺伝子操作などにおいて原核生物細胞が使用される場合、原核生物細胞としては、Escherichia属、Serratia属、Bacillus属、Brevibacterium属、Corynebacterium属、Microbacterium属、Pseudomonas属などに属する原核生物細胞、例えば、Escherichia coli XL1-Blue、Escherichia coli XL2-Blue、Escherichia coli DH1が例示される。

#### 【0403】

本明細書において使用される場合、動物細胞としては、マウス・ミエローマ細胞、ラット・ミエローマ細胞、マウス・ハイブリドーマ細胞、チャイニーズ・ハムスターの細胞であるCHO細胞、BHK細胞、アフリカミドリザル腎臓細胞、ヒト白血病細胞、HBT5637(特開昭63-299)、ヒト結腸癌細胞株などを挙げることができる。マウス・ミエローマ細胞としては、ps20、NSOなど、ラット・ミエローマ細胞としてはYB

2/0など、ヒト胎児腎臓細胞としてはHEK293 (ATCC:CRL-1573) など、ヒト白血病細胞としてはBAL-1など、アフリカミドリザル腎臓細胞としてはCOS-1、COS-7、ヒト結腸癌細胞株としてはHCT-15、ヒト神経芽細胞腫SK-N-SH、SK-N-SH-5Y、マウス神経芽細胞腫Neuro2Aなどが例示される。

#### 【0404】

本明細書において使用される場合、組換えベクターの導入方法としては、DNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、塩化カルシウム法、エレクトロポレーション法 [Methods. Enzymol., 194, 182 (1990)]、リポフェクション法、スフェロプラスト法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 1929 (1978)]、酢酸リチウム法 [J. Bacteriol., 153, 163 (1983)]、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1929 (1978) 記載の方法などが例示される。

#### 【0405】

本明細書において、レトロウイルスの感染方法は、例えば、Current Protocols in Molecular Biology 前出 (特にUnits 9.9-9.14) などに記載されるように、当該分野において周知であり、例えば、トリプシナイズして胚性幹細胞を単一細胞懸濁物 (single-cell suspension) にした後、ウイルス産生細胞 (virus-producing cells) (パッケージング細胞株=packaging cell lines) の培養上清と一緒に1~2時間共培養 (co-culture) することにより、十分量の感染細胞を得ることができる。

#### 【0406】

本明細書において使用されるゲノムまたは遺伝子座などを除去する方法において用いられる、Cre酵素の一過的発現、染色体上でのDNAマッピングなどは、細胞工学別冊実験プロトコルシリーズ「FISH実験プロトコル ヒト・ゲノム解析から染色体・遺伝子診断まで」松原謙一、吉川 寛 監修 秀潤社 (東京) などに記載されるように、当該分野において周知である。

#### 【0407】

本明細書において遺伝子発現 (たとえば、mRNA発現、ポリペプチド発現) の「検出」または「定量」は、例えば、mRNAの測定および免疫学的測定方法を含む適切な方法を用いて達成され得る。分子生物学的測定方法としては、例えば、ノーザンブロット法、ドットブロット法またはPCR法などが例示される。免疫学的測定方法としては、例えば、方法としては、マイクロタイタープレートを用いるELISA法、RIA法、蛍光抗体法、ウェスタンブロット法、免疫組織染色法などが例示される。また、定量方法としては、ELISA法またはRIA法などが例示される。アレイ (例えば、DNAアレイ、プロテインアレイ) を用いた遺伝子解析方法によっても行われ得る。DNAアレイについては、(秀潤社編、細胞工学別冊「DNAマイクロアレイと最新PCR法」) に広く概説されている。プロテインアレイについては、Nat Genet. 2002 Dec; 32 Suppl: 526-32に詳述されている。遺伝子発現の分析法としては、上述に加えて、RT-PCR、RACE法、SSCP法、免疫沈降法、two-hybridシステム、インビトロ翻訳などが挙げられるがそれらに限定されない。そのようなさらなる分析方法は、例えば、ゲノム解析実験法・中村祐輔ラボ・マニュアル、編集・中村祐輔 羊土社 (2002) などに記載されており、本明細書においてそれらの記載はすべて参考として援用される。

#### 【0408】

本明細書において「発現量」とは、対象となる細胞などにおいて、ポリペプチドまたはmRNAが発現される量をいう。そのような発現量としては、本発明の抗体を用いてELISA法、RIA法、蛍光抗体法、ウェスタンブロット法、免疫組織染色法などの免疫学的測定方法を含む任意の適切な方法により評価される本発明ポリペプチドのタンパク質レ

ベルでの発現量、またはノーザンブロット法、ドットブロット法、PCR法などの分子生物学的測定方法を含む任意の適切な方法により評価される本発明のポリペプチドのmRNAレベルでの発現量が挙げられる。「発現量の変化」とは、上記免疫学的測定方法または分子生物学的測定方法を含む任意の適切な方法により評価される本発明のポリペプチドのタンパク質レベルまたはmRNAレベルでの発現量が増加あるいは減少することを意味する。

【0409】

本明細書において「上流」という用語は、特定の基準点からポリヌクレオチドの5'末端に向かう位置を示す。

【0410】

本明細書において「下流」という用語は、特定の基準点からポリヌクレオチドの3'末端に向かう位置を示す。

【0411】

本明細書において「塩基対の」および「Watson & Crick塩基対の」という表現は、本明細書では同義に用いられ、二重らせん状のDNAにおいて見られるものと同様に、アデニン残基が2つの水素結合によってチミン残基またはウラシル残基と結合し、3つの水素結合によってシトシン残基とグアニン残基とが結合するという配列の正体に基づいて互いに水素結合可能なヌクレオチドを示す(Stryer, L., Biochemistry, 4th edition, 1995を参照)。このような塩基対は、相互作用を考慮する際に重要である。

【0412】

本明細書において「相補的」または「相補体」という用語は、本明細書では、相補領域全体がそのまま別の特定のポリヌクレオチドとWatson & Crick塩基対を形成することのできるポリヌクレオチドの配列を示す。本発明の目的で、第1のポリヌクレオチドの各塩基がその相補塩基と対になっている場合に、この第1のポリヌクレオチドは第2のポリヌクレオチドと相補であるとみなす。相補塩基は一般に、AとT（あるいはAとU）、またはCとGである。本願明細書では、「相補」という語を「相補ポリヌクレオチド」、「相補核酸」および「相補ヌクレオチド配列」の同義語として使用する。これらの用語は、その配列のみに基づいてポリヌクレオチドの対に適用されるものであり、2つのポリヌクレオチドが事実上結合状態にある特定のセットに適用されるものではない。

【0413】

(ポリペプチドの製造方法)

本発明のポリペプチド（例えば、Pep5、PKC、p75、Rho GDI、MAG、p21、Rho、Rhoキナーゼまたはその改変体もしくはフラグメントなど）をコードするDNAを組み込んだ組換え体ベクターを保有する微生物、動物細胞などに由来する形質転換体を、通常の培養方法に従って培養し、本発明のポリペプチドを生成蓄積させ、本発明の培養物より本発明のポリペプチドを採取することにより、本発明に係るポリペプチドを製造することができる。

【0414】

本発明の形質転換体を培地に培養する方法は、宿主の培養に用いられる通常の方法に従って行うことができる。大腸菌等の原核生物あるいは酵母等の真核生物を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、本発明の生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含有し、形質転換体の培養を効率的に行える培地であれば天然培地、合成培地のいずれを用いてもよい。

【0415】

炭素源としては、それぞれの微生物が資化し得るものであればよく、グルコース、フラクトース、スクロース、これらを含む糖蜜、デンプンあるいはデンプン加水分解物等の炭水化物、酢酸、プロピオン酸等の有機酸、エタノール、プロパノール等のアルコール類を用いることができる。

【0416】



窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の各種無機酸または有機酸のアンモニウム塩、その他含窒素物質、ならびに、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンステープリカー、カゼイン加水分解物、大豆粕および大豆粕加水分解物、各種発酵菌体およびその消化物等を用いることができる。

#### 【0417】

無機塩としては、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、炭酸カルシウム等を用いることができる。培養は、振盪培養または深部通気攪拌培養等の好气的条件下で行う。

#### 【0418】

培養温度は15～40℃がよく、培養時間は、通常5時間～7日間である。培養中pHは、3.0～9.0に保持する。pHの調整は、無機あるいは有機の酸、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウム、アンモニア等を用いて行う。また培養中に必要に応じて、アンピシリンまたはテトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

#### 【0419】

プロモーターとして誘導性のプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときには、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。例えば、lacプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはイソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド等を、trpプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはインドールアクリル酸等を培地に添加してもよい。遺伝子を導入した細胞または器官は、ジャーファーマンターを用いて大量培養することができる。

#### 【0420】

例えば、動物細胞を用いる場合、本発明の細胞を培養する培地は、一般に使用されているRPMI1640培地(The Journal of the American Medical Association, 199, 519 (1967))、EagleのMEM培地(Science, 122, 501 (1952))、DMEM培地(Virology, 8, 396 (1959))、199培地(Proceedings of the Society for the Biological Medicine, 73, 1 (1950))またはこれら培地にウシ胎児血清等を添加した培地等が用いられる。

#### 【0421】

培養は、通常pH6～8、25～40℃、5%CO<sub>2</sub>存在下等の条件下で1～7日間行う。また培養中に必要に応じて、カナマイシン、ペニシリン、ストレプトマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

#### 【0422】

本発明のポリペプチドをコードする核酸配列で形質転換された形質転換体の培養物から、本発明のポリペプチドを単離または精製するためには、当該分野で周知慣用の通常の酵素の単離または精製法を用いることができる。例えば、本発明のポリペプチドが本発明のポリペプチド製造用形質転換体の細胞外に本発明のポリペプチドが分泌される場合には、その培養物を遠心分離等の手法により処理し、可溶性画分を取得する。その可溶性画分から、溶媒抽出法、硫酸等による塩析法脱塩法、有機溶媒による沈澱法、ジエチルアミノエチル(DEAE)-Sephacrose、DIAION HPA-75(三菱化成)等樹脂を用いた陰イオン交換クロマトグラフィー法、S-Sepharose FF(Pharmacia)等の樹脂を用いた陽イオン交換クロマトグラフィー法、ブチルセファロース、フェニルセファロース等の樹脂を用いた疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用いたゲルろ過法、アフィニティークロマトグラフィー法、クロマトフォーカシング法、等電点電気泳動等の電気泳動法等の手法を用い、精製標品を得ることができる。

#### 【0423】

本発明のポリペプチド（例えば、Pep5、PKC、p75、Rho GDI、MAG、p21、Rho、Rhoキナーゼまたはその改変体もしくはフラグメントなど）が本発明のポリペプチド製造用形質転換体の細胞内に溶解状態で蓄積する場合には、培養物を遠心分離することにより、培養物中の細胞を集め、その細胞を洗浄した後に、超音波破碎機、フレンチプレス、マントンガウリンホモジナイザー、ダイノミル等により細胞を破碎し、無細胞抽出液を得る。その無細胞抽出液を遠心分離することにより得られた上清から、溶媒抽出法、硫酸等による塩析法脱塩法、有機溶媒による沈澱法、ジエチルアミノエチル（DEAE）-Sephacrose、DIAION HPA-75（三菱化成）等樹脂を用いた陰イオン交換クロマトグラフィー法、S-Sephacrose FF（Pharmacia）等の樹脂を用いた陽イオン交換クロマトグラフィー法、ブチルセファロース、フェニルセファロース等の樹脂を用いた疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用いたゲルろ過法、アフィニティークロマトグラフィー法、クロマトフォーカシング法、等電点電気泳動等の電気泳動法等の手法を用いることによって、精製標品を得ることができる。

#### 【0424】

本発明のポリペプチドが細胞内に不溶体を形成して発現した場合は、同様に細胞を回収後破碎し、遠心分離を行うことにより得られた沈澱画分より、通常の方法により本発明のポリペプチドを回収後、そのポリペプチドの不溶体をポリペプチド変性剤で可溶化する。この可溶化液を、ポリペプチド変性剤を含まないあるいはポリペプチド変性剤の濃度がポリペプチドが変性しない程度に希薄な溶液に希釈、あるいは透析し、本発明のポリペプチドを正常な立体構造に構成させた後、上記と同様の単離精製法により精製標品を得ることができる。

#### 【0425】

また、通常のタンパク質の精製方法[J. Evan. Sadlerら: Methods in Enzymology, 83, 458]に準じて精製できる。また、本発明のポリペプチドを他のタンパク質との融合タンパク質として生産し、融合したタンパク質に親和性をもつ物質を用いたアフィニティークロマトグラフィーを利用して精製することもできる[山川彰夫, 実験医学(Experimental Medicine), 13, 469-474(1995)]。例えば、Loweらの方法[Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 86, 8227-8231(1989)、Genes Devel., 4, 1288(1990)]に記載の方法に準じて、本発明のポリペプチドをプロテインAとの融合タンパク質として生産し、イムノグロブリンGを用いるアフィニティークロマトグラフィーにより精製することができる。

#### 【0426】

また、本発明のポリペプチドをFLAGペプチドとの融合タンパク質として生産し、抗FLAG抗体を用いるアフィニティークロマトグラフィーにより精製することができる[Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 86, 8227(1989)、Genes Devel., 4, 1288(1990)]。このような融合タンパク質では、発現ベクターにおいて、タンパク質分解切断部位は、融合タンパク質の精製に続いて、融合部分からの組換えタンパク質の分離を可能にするために、融合部分と組換えタンパク質との接合部に導入される。このような酵素およびこれらの同族の認識配列は、第Xa因子、トロンピン、およびエンテロキナーゼを含む。代表的な融合発現ベクターとしては、それぞれ、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)、マルトースE結合タンパク質、またはプロテインAを標的組換えタンパク質に融合する、pGEX(Pharmacia Biotech; SmithおよびJohnson(1988) Gene 67, 31-40)、pMAL(New England Biolabs, Beverly, Mass.)およびpRIT5(Pharmacia, Piscataway, N. J.)が挙げられる。

#### 【0427】

さらに、本発明のポリペプチド自身に対する抗体を用いたアフィニティークロマトグラフィーで精製することもできる。本発明のポリペプチドは、公知の方法[J. Biomo

l e c u l a r N M R , 6 , 1 2 9 - 1 3 4 , S c i e n c e , 2 4 2 , 1 1 6 2 - 1 1 6 4 , J . B i o c h e m . , 1 1 0 , 1 6 6 - 1 6 8 ( 1 9 9 1 ) ] に準じて、i n v i t r o 転写・翻訳系を用いて生産することができる。

#### 【0428】

本発明のポリペプチドは、そのアミノ酸情報を基に、Fmoc法（フルオレニルメチルオキシカルボニル法）、tBoc法（t-ブチルオキシカルボニル法）等の化学合成法によっても製造することができる。また、Advanced ChemTech、Applied Biosystems、Pharmacia Biotech、Protein Technology Instrument、Synthecell-Vega、PerSeptive、島津製作所等のペプチド合成機を利用し化学合成することもできる。

#### 【0429】

精製した本発明のポリペプチドの構造解析は、タンパク質化学で通常用いられる方法、例えば遺伝子クローニングのためのタンパク質構造解析（平野久著、東京化学同人発行、1993年）に記載の方法により実施可能である。本発明のポリペプチドの生理活性は、公知の測定法に準じて測定することができる。

#### 【0430】

本発明において有用な可溶性ポリペプチドの産生もまた、当該分野で公知の種々の方法によって達成され得る。例えば、ポリペプチドは、エキソペプチダーゼ、エンドマン分解またはその両方と組み合わせて特定のエンドペプチダーゼを使用することによるタンパク質分解によって、インタクトな膜貫通p75ポリペプチド分子から誘導され得る。このインタクトなp75ポリペプチド分子は、従来の方法を使用して、その天然の供給源から精製され得る。あるいは、インタクトなp75ポリペプチドは、cDNA、発現ベクターおよび組換え遺伝子発現のための周知技術を利用する組換えDNA技術によって生成され得る。

#### 【0431】

好ましくは、本発明において有用な可溶性ポリペプチドは、直接的に産生され、従って、出発材料としてのp75ポリペプチド全体の必要性を排除する。これは、従来の化学合成技術によって達成され得るか、または周知の組換えDNA技術（ここで、所望のペプチドをコードするDNA配列のみが形質転換された宿主で発現される）によって達成され得る。例えば、所望の可溶性p75ポリペプチドをコードする遺伝子は、オリゴヌクレオチド合成機を使用する化学的手段によって合成され得る。このようなオリゴヌクレオチドは、所望の可溶性p75ポリペプチドのアミノ酸配列に基づいて設計される。所望のペプチドをコードする特定のDNA配列はまた、特定の制限エンドヌクレアーゼフラグメントの単離によってか、またはcDNAからの特定の領域のPCR合成によって、全長DNA配列から誘導され得る。

#### 【0432】

（変異型ポリペプチドの作製方法）

本発明のポリペプチド（例えば、Pep5、PKC、p75、Rho GDI、MAG、p21、Rho、Rhoキナーゼなど）のアミノ酸の欠失、置換もしくは付加（融合を含む）は、周知技術である部位特異的変異誘発法により実施することができる。かかる1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加は、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)、Current Protocols in Molecular Biology, Supplement 1~38, John Wiley & Sons (1987-1997)、Nucleic Acids Research, 10, 6487 (1982)、Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 79, 6409 (1982)、Gene, 34, 315 (1985)、Nucleic Acid's Research, 13, 4431 (1985)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 4

88 (1985)、Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 81, 5662 (1984)、Science, 224, 1431 (1984)、PCT WO85/00817 (1985)、Nature, 316, 601 (1985)等に記載の方法に準じて調製することができる。

#### 【0433】

(合成化学)

本明細書におけるペプチド、化学物質、低分子などの因子は、合成化学技術を用いて合成することができる。そのような合成化学技術は、当該分野において周知の技術を用いることができる。そのような周知技術としては、例えば、Fiesers' Reagents for Organic Synthesis (Fieser's Reagents for Organic Synthesis) Tse-Lok Ho, John Wiley & Sons Inc (2002)などを参照することができる。

#### 【0434】

本発明の因子が化合物として利用される場合、塩形態で用いることができる。「塩」としては、製薬上許容される塩が好ましく、例えば無機塩基との塩、有機塩基との塩、無機酸との塩、有機酸との塩、塩基性または酸性アミノ塩とのなどが挙げられる。無機塩基との塩としては、ナトリウム塩、カリウム塩などのアルカリ金属塩、カルシウム塩、マグネシウム塩、バリウム塩などのアルカリ土類金属塩、ならびにアルミニウム塩、アンモニウム塩などが挙げられる。有機塩基との塩としては、トリメチルアミン、トリエチルアミン、ピリジン、ピコリン、エタノールアミン、ジエタノールアミン、トリエタノールアミン、ジシクロヘキシルアミン、N, N'-ジベンジルエチレンジアミンなどとの塩が挙げられる。無機酸との塩としては、塩酸、フッ化水素酸、臭化水素酸、硝酸、硫酸、リン酸、過塩素酸、ヨウ化水素酸などとの塩が挙げられる。有機酸との塩としては、ギ酸、酢酸、トリフルオロ酢酸、フマル酸、シュウ酸、酒石酸、マレイン酸、クエン酸、コハク酸、リンゴ酸、マンデル酸、アスコルビン酸、乳酸、グルコン酸、メタンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸などとの塩が挙げられる。塩基性アミノ酸との塩としては、アルギニン、リジン、オルニチンなどとの塩が挙げられ、酸性アミノ酸との塩としては、アスパラギン酸、グルタミン酸などとの塩が挙げられる。

#### 【0435】

本発明の因子が化合物として利用される場合、水和物形態で用いることができる。「水和物」としては、薬理学的に許容される水和物が好ましく、また、含水塩も含まれ。具体的には、一水和物、二水和物、六水和物等が挙げられる。

#### 【0436】

(コンビナトリアルケミストリ)

本発明で使用する化合物は、例えば、コンビナトリアルケミストリー技術、醗酵方法、植物および細胞抽出手順などが挙げられるがこれらに限定されない、いずれかの手段により、作製することができるかまたは入手することができる。コンビナトリアルライブラリを作成する方法は、当該技術分野で周知である。例えば、E. R. Felder, *Chimia* 1994, 48, 512-541; Gallopら, *J. Med. Chem.* 1994, 37, 1233-1251; R. A. Houghten, *Trends Genet.* 1993, 9, 235-239; Houghtenら, *Nature* 1991, 354, 84-86; Lamら, *Nature* 1991, 354, 82-84; Carrellら, *Chem. Biol.* 1995, 3, 171-183; Maddenら, *Perspectives in Drug Discovery and Design* 2, 269-282; Cwirllaら, *Biochemistry* 1990, 87, 6378-6382; Brennerら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992, 89, 5381-5383; Gordonら, *J. Med. Chem.* 1994, 37, 1385-1401; Leblら, *Biopolymers* 1995, 37, 177-198; およびそれらで引用された参考文献を参照のこと。これらの参考文献は、その全体を、本明細書中で参考として援用する。

#### 【0437】

#### (免疫化学)

本発明のポリペプチド (例えば、Pep5、PKC、p75、Rho GDI、MAG、p21、Rho、Rhoキナーゼまたはその改変体もしくはフラグメントなど) を認識する抗体の作製もまた当該分野において周知である。例えば、ポリクローナル抗体の作製は、取得したポリペプチドの全長または部分断片精製標品、あるいは本発明のタンパク質の一部のアミノ酸配列を有するペプチドを抗原として用い、動物に投与することにより行うことができる。

#### 【0438】

抗体を生産する場合、投与する動物として、ウサギ、ヤギ、ラット、マウス、ハムスター等を用いることができる。その抗原の投与量は動物1匹当たり50~100 $\mu$ gが好ましい。ペプチドを用いる場合は、ペプチドをスカシガイヘモシアニン (keyhole limpet haemocyanin) またはウシチログロブリン等のキャリアタンパク質に共有結合させたものを抗原とするのが望ましい。抗原とするペプチドは、ペプチド合成機で合成することができる。その抗原の投与は、1回目の投与の後1~2週間おきに3~10回行う。各投与後、3~7日目に眼底静脈叢より採血し、その血清が免疫に用いた抗原と反応することを酵素免疫測定法 [酵素免疫測定法 (ELISA法): 医学書院刊 1976年、Antibodies-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)] 等で確認する。

#### 【0439】

免疫に用いた抗原に対し、その血清が十分な抗体価を示した非ヒト哺乳動物より血清を取得し、その血清より、周知技術を用いてポリクローナル抗体を分離、精製することができる。モノクローナル抗体の作製もまた当該分野において周知である。抗体産性細胞の調製のために、まず、免疫に用いた本発明のポリペプチドの部分断片ポリペプチドに対し、その血清が十分な抗体価を示したラットを抗体産生細胞の供給源として使用し、骨髓腫細胞との融合により、ハイブリドーマの作製を行う。その後、酵素免疫測定法になどより、本発明のポリペプチドの部分断片ポリペプチドに特異的に反応するハイブリドーマを選択する。このようにして得たハイブリドーマから産生されたモノクローナル抗体は種々の目的に使用することができる。

#### 【0440】

このような抗体は、例えば、本発明のポリペプチドの免疫学的検出方法に使用することができ、本発明の抗体を用いる本発明のポリペプチドの免疫学的検出法としては、マイクロタイタープレートを用いるELISA法・蛍光抗体法、ウェスタンブロット法、免疫組織染色法等を挙げることができる。

#### 【0441】

また、本発明ポリペプチドの免疫学的定量方法にも使用することができる。本発明ポリペプチドの定量方法としては、液相中で本発明のポリペプチドと反応する抗体のうちエпитープが異なる2種類のモノクローナル抗体を用いたサンドイッチELISA法、<sup>126</sup>I等の放射性同位体で標識した本発明のタンパク質と本発明のタンパク質を認識する抗体とを用いるラジオイムノアッセイ法等を挙げることができる。

#### 【0442】

本発明のポリペプチドのmRNAの定量方法もまた、当該分野において周知である。例えば、本発明のポリヌクレオチドあるいはDNAより調製した上記オリゴヌクレオチドを用い、ノーザンハイブリダイゼーション法またはPCR法により、本発明のポリペプチドをコードするDNAの発現量をmRNAレベルで定量することができる。このような技術は、当該分野において周知であり、本明細書において列挙した文献にも記載されている。

#### 【0443】

当該分野で公知の任意の方法によって、これらのポリヌクレオチドが得られ得、そしてこれらポリヌクレオチドのヌクレオチド配列が、決定され得る。例えば、抗体のヌクレオチド配列が公知である場合、この抗体をコードするポリヌクレオチドは、化学的に合成さ

れたオリゴヌクレオチドからアセンブルされ得（例えば、Kutmeierら、Bio Techniques 17:242 (1994) に記載されるように）、これは、手短に言えば、抗体をコードする配列の部分を含むオーバーラップするヌクレオチドの合成、それらのオリゴヌクレオチドのアニーリングおよび連結、ならびに次いでPCRによるこの連結されたオリゴヌクレオチドの増幅を含む。

#### 【0444】

抗体をコードするポリヌクレオチドは、適切な供給源由来の核酸から作製することができる。ある抗体をコードする核酸を含むクローンは入手不可能だが、その抗体分子の配列が既知である場合、免疫グロブリンをコードする核酸は、化学的に合成され得るか、あるいは適切な供給源（例えば、抗体cDNAライブラリーまたは抗体を発現する任意の組織もしくは細胞（例えば、本発明の抗体の発現のために選択されたハイブリドーマ細胞）から生成されたcDNAライブラリー、またはそれから単離された核酸（好ましくはポリA+RNA））から、例えば、抗体をコードするcDNAライブラリーからのcDNAクローンを同定するために、その配列の3'末端および5'末端にハイブリダイズ可能な合成プライマーを使用するPCR増幅によって、またはその特定の遺伝子配列に特異的なオリゴヌクレオチドプローブを使用するクローニングによって得ることができる。PCRによって作製された増幅された核酸は、当該分野で周知の任意の方法を用いて、複製可能なクローニングベクターにクローニングされ得る。

#### 【0445】

一旦、抗体のヌクレオチド配列および対応するアミノ酸配列が決定されると、抗体のヌクレオチド配列は、ヌクレオチド配列の操作について当該分野で周知の方法（例えば、組換えDNA技術、部位指向性変異誘発、PCRなど（例えば、Sambrookら、1990, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 第2版、Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NYおよびAusubelら編、1998, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NYに記載の技術を参照のこと。これらは両方がその全体において本明細書に参考として援用される。））を用いて操作され、例えば、アミノ酸の置換、欠失、および/または挿入を生成するように異なるアミノ酸配列を有する抗体を作製し得る。

#### 【0446】

特定の実施形態において、重鎖可変ドメインおよび/または軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列は、相補性決定領域(CDR)の配列の同定のために、当該分野において周知の方法によって（例えば、配列超可変性の領域を決定するために、他の重鎖可変領域および軽鎖可変領域の既知のアミノ酸配列と比較することによって）調べられ得る。慣用的な組換えDNA技術を用いて、1つ以上のCDRが、前述のようにフレームワーク領域内に（例えば、非ヒト抗体をヒト化するために、ヒトフレームワーク領域中に）挿入され得る。このフレームワーク領域は天然に存在し得るか、またはコンセンサスフレームワーク領域であり得、そして好ましくはヒトフレームワーク領域であり得る（例えば、列挙したヒトフレームワーク領域については、Chothiaら、J. Mol. Biol. 278:457-479 (1998) を参照のこと）。好ましくは、フレームワーク領域およびCDRの組み合わせによって生成されたポリヌクレオチドは、本発明のポリペプチドに特異的に結合する抗体をコードする。好ましくは、上記に議論されるように、1つ以上のアミノ酸置換は、フレームワーク領域内で作製され得、そして好ましくは、そのアミノ酸置換は、抗体のその抗原への結合を改善する。さらに、このような方法は、1つ以上の鎖内ジスルフィド結合が欠如した抗体分子を生成するように、鎖内ジスルフィド結合に関与する1つ以上の可変領域のシステイン残基のアミノ酸置換または欠失を作製するために使用され得る。ポリヌクレオチドへの他の変更は、本発明によって、および当該分野の技術において包含される。

#### 【0447】

さらに、適切な抗原特異性のマウス抗体分子由来の遺伝子を、適切な生物学的活性のヒ

ト抗体分子由来の遺伝子と共にスプライシングさせることによって、「キメラ抗体」の産生のために開発された技術 (Morrisonら、Proc. Natl. Acad. Sci. 81:851-855 (1984); Neubergerら、Nature 312:604-608 (1984); Takedaら、Nature 314:452-454 (1985)) が使用され得る。上記のように、キメラ抗体は、異なる部分が異なる動物種に由来する分子であり、このような分子は、マウスmAbおよびヒト免疫グロブリンの定常領域由来の可変領域を有する (例えば、ヒト化抗体)。

#### 【0448】

単鎖抗体を製造する場合、単鎖抗体の産生に関する記載された公知の技術 (米国特許第 4,946,778号; Bird、Science 242:423-42 (1988); Hustonら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883 (1988); および Wardら、Nature 334:544-54 (1989)) が、利用され得る。単鎖抗体は、Fv領域の重鎖フラグメントおよび軽鎖フラグメントがアミノ酸架橋を介して連結されることによって形成され、単鎖ポリペプチドを生じる。E. coliにおける機能性Fvフラグメントのアセンブリのための技術もまた、使用され得る (Skerraら、Science 242:1038-1041 (1988))。

#### 【0449】

(抗体を産生する方法)

本発明の抗体は、抗体の合成のために当該分野で公知の任意の方法によって、化学合成によって、または、好ましくは、組換え発現技術によって産生され得る。

#### 【0450】

本発明の抗体、またはそのフラグメント、誘導体もしくはアナログ (例えば、本発明の抗体の重鎖もしくは軽鎖または本発明の単鎖抗体) の組換え発現は、その抗体をコードするポリヌクレオチドを含有する発現ベクターの構築を必要とする。一旦、本発明の抗体分子または抗体の重鎖もしくは軽鎖、あるいはそれらの部分 (好ましくは、重鎖または軽鎖の可変ドメインを含有する) をコードするポリヌクレオチドが得られると、抗体分子の産生のためのベクターは、当該分野で周知の技術を用いる組換えDNA技術によって生成され得る。従って、抗体をコードするヌクレオチド配列を含有するポリヌクレオチドの発現によってタンパク質を調製するための方法は、本明細書に記載される。当業者に周知の方法は、抗体をコードする配列ならびに適切な転写制御シグナルおよび翻訳制御シグナルを含有する発現ベクターの構築のために使用され得る。これらの方法としては、例えば、インビトロの組換えDNA技術、合成技術、およびインビボの遺伝子組換えが挙げられる。従って、本発明は、プロモーターに作動可能に連結された、本発明の抗体分子、あるいはその重鎖もしくは軽鎖、または重鎖もしくは軽鎖の可変ドメインをコードするヌクレオチド配列を含む、複製可能なベクターを提供する。このようなベクターは、抗体分子の定常領域 (例えば、PCT公開 WO86/05807; PCT公開 WO89/01036; および米国特許第5,122,464号を参照のこと) をコードするヌクレオチド配列を含み得、そしてこの抗体の可変ドメインは、重鎖または軽鎖の全体の発現のためにこのようなベクターにクローニングされ得る。

#### 【0451】

この発現ベクターは、従来技術によって宿主細胞へと移入され、次いで、このトランスフェクトされた細胞は、本発明の抗体を産生するために、従来技術によって培養される。従って、本発明は、異種プロモーターに作動可能に連結された、本発明の抗体、あるいはその重鎖もしくは軽鎖、または本発明の単鎖抗体をコードするポリヌクレオチドを含む宿主細胞を含む。二重鎖抗体の発現についての好ましい実施形態において、重鎖および軽鎖の両方をコードするベクターは、以下に詳述されるように、免疫グロブリン分子全体の発現のために宿主細胞中に同時発現され得る。

#### 【0452】

本発明の関連した局面において、薬学的組成物 (例えば、ワクチン組成物) が、予防適

用または治療適用のために提供される。このような組成物は、一般に、本発明の免疫原性ポリペプチドまたはポリヌクレオチドおよび免疫刺激剤（例えば、アジュバント）を含む。

#### 【0453】

本発明の抗体（例えば、モノクローナル抗体）は、標準的な技術（例えば、親和性クロマトグラフィーまたは免疫沈降）によって、本発明のポリペプチドなどを単離するために用いられ得る。ある因子に特異的な抗体は、細胞からの天然の因子、そして宿主細胞において発現される組換え的に産生された因子の精製を容易にし得る。さらに、そのような抗体が、（例えば、細胞の溶解液または細胞上清における）本発明のタンパク質を検出するために用いられ、本発明のタンパク質の発現の存在の量およびパターンを評価し得る。このような抗体は、例えば、所定の処置レジメンの有効性を決定するために、臨床試験の手順の一部として組織におけるタンパク質レベルを診断的にモニターするために用いられ得る。検出は、抗体を検出可能物質に連結する（すなわち、物理的に連結する）ことにより容易になり得る。検出可能物質の例としては、種々の酵素、補欠分子族、蛍光物質、発光物質、生物発光物質および放射性物質が挙げられる。適切な酵素の例としては、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼまたはアセチルコリンエステラーゼが挙げられる；適切な補欠分子族複合体の例としては、ストレプトアビジン/ビオチンおよびアビジン/ビオチンが挙げられる；適切な蛍光物質の例としては、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミン（dichlorotriazinylamine）フルオレセイン、ダンシルクロリドまたはフィコエリトリンが挙げられる；発光物質の例としては、ルミノールが挙げられる；生物発光物質の例としては、ルシフェラーゼ、ルシフェリンおよびエクオリンが挙げられ；そして、適切な放射性物質の例としては $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{35}\text{S}$ または $^3\text{H}$ が挙げられるがそれらに限定されない。

#### 【0454】

本発明の別の局面は、哺乳動物において、免疫応答を誘導するに十分な量のポリペプチドをこの哺乳動物に投与することにより本発明のポリペプチドに対する免疫応答を誘導する方法に関する。この量は、動物種、動物の大きさなどに依存するが、当業者により決定され得る。

#### 【0455】

（スクリーニング）

本明細書において「スクリーニング」とは、目的とするある特定の性質をもつ生物または物質などの標的を、特定の操作／評価方法で多数を含む集団の中から選抜することをいう。スクリーニングのために、本発明の因子（例えば、抗体）、ポリペプチドまたは核酸分子を使用することができる。スクリーニングは、インビトロ、インビボなど実在物質を用いた系を使用してもよく、インシリコ（コンピュータを用いた系）の系を用いて生成されたライブラリーを用いてもよい。本発明では、所望の活性を有するスクリーニングによって得られた化合物もまた、本発明の範囲内に包含されることが理解される。また本発明では、本発明の開示をもとに、コンピュータモデリングによる薬物が提供されることも企図される。

#### 【0456】

1 実施形態において、本発明は、本発明のタンパク質または本発明のポリペプチド、あるいはその生物学的に活性な部分に結合するか、またはこれらの活性を調節する、候補化合物もしくは試験化合物をスクリーニングするためのアッセイを提供する。本発明の試験化合物は、当該分野において公知のコンビナトリアルライブラリー法における多数のアプローチの任意のものを使用して得られ得、これには、以下が挙げられる：生物学的ライブラリー；空間的にアクセス可能な平行固相もしくは溶液相ライブラリー；逆重畳を要する合成ライブラリー法；「1 ビーズ 1 化合物」ライブラリー法；およびアフィニティークロマトグラフィー選択を使用する合成ライブラリー法。生物学的ライブラリーアプローチはペプチドライブラリーに限定されるが、他の 4 つのアプローチは、ペプチド、非ペプチド



オリゴマーもしくは化合物の低分子ライブラリーに適用可能である (Lam (1997) *Anticancer Drug Des.* 12:145)。

【0457】

分子ライブラリーの合成のための方法の例は、当該分野において、例えば以下に見出され得る: DeWittら (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6909; Erbら (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:11422; Zuckermannら (1994) *J. Med. Chem.* 37:2678; Choら (1993) *Science* 261:1303; Carrellら (1994) *Angew Chem. Int. Ed. Engl.* 33:2059; Carrellら (1994) *Angew Chem. Int. Ed. Engl.* 33:2061; および Gallopら (1994) *J. Med. Chem.* 37:1233。

【0458】

化合物のライブラリーは、溶液中で (例えば、Houghten (1992) *BioTechniques* 13:412~421)、あるいはビーズ上 (Lam (1991) *Nature* 354:82~84)、チップ上 (Fodor (1993) *Nature* 364:555~556)、細菌 (Ladner 米国特許第5,223,409号)、孢子 (Ladner、上記)、プラスミド (Cullら (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:1865~1869) またはファージ上 (ScottおよびSmith (1990) *Science* 249:386~390; Devlin (1990) *Science* 249:404~406; Cwirllaら (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87:6378~6382; Felici (1991) *J. Mol. Biol.* 222:301~310; Ladner 上記) において示され得る。

【0459】

(神経疾患および再生)

本明細書中に使用される用語「軸索」は、ニューロンからの長い細胞の突出をいう。軸索によって、活動電位が、細胞体へまたは細胞体から伝導される。

【0460】

本明細書中に使用される用語「軸索成長」は、長い突起または軸索の伸長をいう。軸索は、細胞体で発生し、そして成長円錐に続く。

【0461】

本明細書中に使用される用語「成長円錐」は、局所的環境の感知およびその適切なシナプスの標的細胞への軸索の移動を担う、成長する神経突起の先端の特定の領域をいう。

【0462】

本明細書中に使用される用語「成長円錐移動」は、ニューロンの標的細胞へ向かう成長円錐の伸長または崩壊をいう。

【0463】

本明細書中に使用される用語「神経突起」は、ニューロンから成長する突起のことをいう。培養物中で樹状突起と軸索を区別することは時折困難であるので、この用語「神経突起」は、両方に関して使用される。

【0464】

本明細書中に使用される用語「稀突起膠細胞」は、その機能がCNS軸索を有髄化することである中枢神経の神経膠細胞をいう。

【0465】

本明細書において「神経疾患」または「神経学的疾患」とは、本明細書において同義で用いられ、神経の機能、構造、器官などの断絶、停止、または障害をいい、通常、次の基準のうち少なくとも2つを満たす病変をいう: 1) 病因物質をもつこと; 2) はっきりと指摘できる徴候および/または症候群があること; 3) 一致した解剖学的変化があること。神経疾患としては、例えば、脳血管障害 (脳出血、くも膜下出血、脳梗塞、一過性脳虚血発作、脳動脈硬化症、Binswanger病、脳静脈洞血栓・脳静脈血栓、高血圧性

脳症、側頭動脈炎、一過性全健忘、もやもや病、線維筋性形成異常症、内頸動脈海綿静脈洞瘻、慢性硬膜下血腫、アミロイドアンギオパチー（Alzheimer病参照）など）；  
脊髄血管障害（例えば、脊髄梗塞、一過性脊髄虚血、脊髄出血、脊髄血管奇形、脊髄くも膜下出血、亜急性壊死性脊髄炎など）；感染性・炎症性疾患（例えば、髄膜炎、脳炎、単純ヘルペス脳炎、日本脳炎、その他の脳炎、狂犬病、遅発性ウイルス感染症（例えば、亜急性硬化性全脳炎、進行性多巣性白質脳症、Creutzfeldt-Jakob病など）、神経Behcet病、小舞蹈病、AIDS痴呆症候群、神経梅毒、脳膿瘍、脊髄硬膜外膿瘍、HTLV-I関連ミエロパチー、ポリオ）；脱髄疾患（多発性硬化症、急性散在性脳脊髄炎、Baló同心円硬化症、炎症性汎発性硬化症、白質ジストロフィー、異染性白質ジストロフィー、Krabbe病、副腎白質ジストロフィー、Canavan病（白質ジストロフィー）、Pelizaeus-Merzbacher病（白質ジストロフィー）、Alexander病（白質ジストロフィー）など）；痴呆性疾患（Alzheimer病、Alzheimer型老年痴呆、Pick病、脳血管性痴呆、Creutzfeldt-Jakob病、Parkinson痴呆複合、正常圧水頭症、進行性核上性麻痺など）；基底核変性疾患（例えば、Parkinson病、症候性parkinsonism、進行性核上性麻痺、線条体黒質変性症、Parkinson痴呆複合、Huntington病、本態性振戦、アテトーゼ、ジストニー症候群（例えば、特発性捻転ジストニー、局所性ジストニー（痙性斜頸、書痙、Meige症候群など）、症候性ジストニー（Hallervorden-Spatz病、薬剤性ジストニーなど）、Gilles de la Tourette症候群など）；脊髄小脳変性疾患（例えば、脊髄小脳変性症（Shy-Drager症候群、Machado-Joseph病など）、Louis-Bar症候群、Bassen-Kornzweig症候群、Refsum病、他の小脳失調症など）；運動ニューロン疾患（例えば、筋萎縮性側索硬化症、進行性球麻痺（筋萎縮性側索硬化症参照）、家族性筋萎縮性側索硬化症、Werdnig-Hoffmann病、Kugelberg-Welander病、球脊髄性筋萎縮症、若年性一側上肢筋萎縮症など）；脳・脊髄の腫瘍性疾患（例えば、頭蓋内腫瘍、脊髄腫瘍、髄膜癌腫症など）；機能性疾患（例えば、てんかん、慢性頭痛、失神（失神参照）、特発性頭蓋内圧亢進症、Meniere病、ナルコレプシー、Kleine-Levin症候群など）；中毒・代謝性疾患（例えば、薬物中毒（フェノチアジン系向精神薬中毒、鎮静・催眠薬中毒、抗生物質中毒、抗Parkinson病薬、抗癌薬中毒、 $\beta$ 遮断薬中毒、Ca拮抗薬中毒、クロフィブラート中毒、制吐薬中毒、スモン、サリチル酸中毒、ジギタリス中毒、麻薬中毒など）、慢性アルコール中毒（Wernicke脳症、Marchiafava-Bignami症候群、橋中心髄鞘崩壊症など）、有機溶剤中毒、農薬中毒（例えば、有機リン剤中毒、カーバメイト剤中毒、クロルピクリン中毒、パラコート中毒など）、有機リン系神経ガス中毒、一酸化炭素中毒、硫化水素中毒、シアン化物中毒、水銀中毒（金属水銀中毒、無機水銀中毒、有機水銀中毒など）、鉛中毒、四エチル鉛中毒、ヒ素中毒、カドミウム中毒、クロム中毒、マンガン中毒、金属熱、睡眠薬・鎮静薬中毒、サリチル酸中毒、ジギタリス中毒、麻薬中毒、食中毒（例えば、自然毒食中毒（フグ中毒、麻痺性貝毒食中毒、下痢性貝毒食中毒、シガテラ、キノコ中毒、ジャガイモ中毒など）、ビタミン欠乏症（ビタミンA欠乏症、ビタミンB1欠乏症、ビタミンB2欠乏症、ペラグラ、壊血病、ビタミン依存症）、リピドーシス（Gaucher病、Niemann-Pick病など）、先天性アミノ酸代謝異常、Wilson病、アミロイドーシスなど）；先天奇形（Arnold-Chiari奇形、Klippel-Feil症候群、頭蓋底陥入症、脊髄空洞症）；神経・皮膚症候群（例えば、母斑症、von-Recklinghausen病、結節性硬化症、Sturge-Weber病、von Hippel-Lindau病など）；脊椎疾患（変形性脊椎症、椎間板ヘルニア、後縦靱帯骨化症など）などが挙げられるがそれらに限定されない。

#### 【0466】

本明細書において「神経障害」とは、神経の機能、構造、あるいは両方の障害で、発育における遺伝、発生上の欠陥、または毒素、外傷、疾病など外因性要因に起因するものを

いう。そのような神経障害としては、例えば、末梢神経障害、糖尿病性神経障害などが挙げられるがそれらに限定されない。末梢神経は各種の原因で障害されるが、原因のいかんを問わずすべての末梢神経の障害は、総称して神経障害（ニューロパシー）と呼ばれる。神経障害の原因としては、例えば、遺伝、感染、中毒、代謝障害、アレルギー、膠原病、癌、血管障害、外傷、機械的圧迫、腫瘍などが挙げられるがそれらに限定されない。神経障害の原因は、臨床では特定されることがあるが、本発明の処置の対象にはそのような原因不明の神経障害も包含される。神経障害としては、実質性神経障害および間質性神経障害が挙げられるがそれらに限定されない。実質性神経障害とは、末梢神経の実質であるニューロン、シュワン細胞および髄鞘の少なくとも1つに病因が作用し、病変が現れたものをいい、間質性神経障害とは、間質に作用して障害が現れるものであり、物理的圧迫、血管性病変（結節性動脈周囲炎、膠原病など）、炎症反応、肉芽組織（例えば、癰結節、サルコイドーシスなど）による障害が挙げられるがそれらに限定されない。ニューロン全体の代謝が障害を受けると、ニューロンの末梢部から変性し、神経細胞に向けて変性が進行し、最終的に神経細胞が萎縮する（逆行性死滅神経障害）。神経障害の症候としては、運動障害、知覚障害、筋力低下、筋萎縮、反射低下、自律神経障害、およびそれらの組み合わせなどが挙げられる。本発明は、このような神経障害の処置、予防などにも有効である。

#### 【0467】

本明細書において「神経の状態」とは、神経の健全度を示す度合いをいう。そのような状態は、種々のパラメータによって表すことができる。本発明により、Pep5、PKC、IP3、p75、Rho GDI、GTLb、MAG、p21などを測定することにより神経の状態が判定できるようになった。

#### 【0468】

本明細書中に使用される用語「中枢神経系障害」は、中枢神経系（CNS）の異常な機能に関連する任意の病理学的状態をいう。この用語は、脳組織に対する物理的外傷、ウイルス感染、自己免疫機構および遺伝的変異から生じる、変化された中枢神経系機能を含むが、これに限定されない。

#### 【0469】

本明細書中に使用される用語「脱髄性疾患」は、稀突起膠細胞の細胞膜のミエリン鞘の変性によって特徴付けられる病理学的障害をいう。

#### 【0470】

本発明の分子および方法を使用して処置され得る例示的疾患、障害および損傷（状態）としては、大脳損傷、脊髄損傷、発作、脱髄疾患（例えば、多発性硬化症）、単語症脱髄、脳脊髄炎、多病巣性白質脳症、汎脳炎、マルキアファーヴァービニャーミ病、海綿状変性、アレグザンダー病、キャナヴァン病、異染性白質萎縮症およびクラッペ病が挙げられるがそれらに限定されない。

#### 【0471】

本明細書において「再生」とは、損傷した組織ないし臓器が元通りに回復することをいい、病的再生ともいう。生物の体は一生の間に外傷や病気によって臓器の一部を失ったり、大きな傷害を受けたりする。その場合、損傷した臓器が再生できるか否かは、臓器によって（または動物種によって）異なる。自然には再生できない臓器（または組織）を再生させ、機能を回復させようというのが再生医学である。組織が再生したかどうかは、その機能が改善したかにどうかによって判定することができる。哺乳動物は、組織・器官（臓器）を再生する力のある程度備えている（例えば、皮膚、肝臓および血液の再生）。しかし、心臓、肺、脳などの臓器、中枢神経などの組織は再生能力に乏しく、一旦損傷すると、その機能を再生させることができないと考えられてきた。従って、従来であれば、例えば、臓器が損傷した場合、臓器移植による処置しかほとんど有効な措置がなく、移植では処置できない中枢神経などの場合は、有効な処置がないに等しい状態であった。従って、本明細書において「再生に有効な量」とは、神経の再生において、有効であると認められる程度の量をいう。

## 【0472】

本明細書において「神経の再生」とは、損傷したかあるいは消失した神経が回復することをいう。従来、成体では特に中枢神経の再生は不可能とされており、いったん神経が機能を損なうと、その再生は困難であった。ここで、神経が再生したかどうかは、運動能力、感覚の評価、組織において神経軸索の再生を評価することなどによって確認することができる。

## 【0473】

本明細書において「予防（する）」は、生物が病気にかかる（c o<sup>N</sup> T<sup>R</sup> a c t）かまたは異常な状態を発生する可能性を減少させることをいう。

## 【0474】

本明細書において「処置（する）」は、治療効果を有すること、および生物における異常な状態を少なくとも部分的に軽減するかまたは抑止することをいう。

## 【0475】

本明細書において「治療効果」は、異常な状態を引き起こすかまたはこれに寄与する阻害因子または活性化因子をいう。治療効果は、異常な状態の症状の1つ以上をある程度緩和する。異常な状態の処置に関して、治療効果とは、以下の1つ以上をいい得る：（a）細胞の増殖（p r o l i f e r a t i o n）、増殖（g r o w t h）、および／または分化における増加；（b）細胞死の阻害（すなわち、遅らせることまたは停止させること）；（c）変性の阻害；（d）異常な状態に関連する症状の1つ以上をある程度緩和する；および（e）罹患した細胞集団の機能を強化すること。異常な状態に対する効力を示す化合物は、本明細書中に記載されるように同定され得る。

## 【0476】

本明細書において「異常な状態」は、生物におけるその正常な機能から逸脱する、生物の細胞または組織における機能をいう。異常な状態は、細胞増殖、細胞分化、細胞シグナル伝達、または細胞生存に関連し得る。異常な状態としてはまた、神経伝達における異常、肥満、網膜変性のような糖尿病合併症、ならびにグルコースの取り込みおよび代謝における不規則性、ならびに脂肪酸の取り込みおよび代謝における不規則性が挙げられ得る。

## 【0477】

異常な細胞増殖状態としては、例えば、神経細胞の異常増殖、線維症およびメサングウム障害のような癌、異常な新脈管形成および脈管形成、創傷治癒、乾癬、糖尿病および炎症が挙げられる。

## 【0478】

異常な分化状態としては、例えば、神経変性障害、緩徐な創傷治癒速度および緩徐な組織移植片治癒速度が挙げられる。

## 【0479】

異常な細胞シグナル伝達状態としては、例えば、過度の神経伝達物質活性を含む精神障害が挙げられる。

## 【0480】

異常な細胞生存状態はまた、アポトーシス（プログラム細胞死）経路が活性化されるかまたは抑止される状態に関連する。多数のタンパク質キナーゼが、アポトーシス経路に関連している。タンパク質キナーゼのいずれか1つの機能における異常は、細胞不死または未熟な細胞死を生じ得る。

## 【0481】

本発明は、神経疾患、障害または異常状態のある（罹患しているおそれのある）被験体または上記障害を有する被験体を処置する、予防的方法および治療的方法の両方を提供する。

## 【0482】

レベルまたは生物学的活性の増加（疾患または障害を罹患しない被験体と比較して）によって特徴付けられる疾患および障害は、活性をアンタゴナイズする（すなわち、減少または阻害する）治療剤で処置され得る。活性をアンタゴナイズする治療剤は、治療様式ま

たは予防様式において投与され得る。利用され得る治療剤としては、限定されないが、以下が挙げられる；(i) p 75 シグナル伝達経路における伝達因子（例えば、ポリペプチド）、またはそのアナログ、誘導体、フラグメントもしくはホモログ；(ii) p 75 シグナル伝達経路における伝達因子に対する抗体；(iii) p 75 シグナル伝達経路における伝達因子をコードする核酸（因子がポリペプチドの場合）；(iv) アンチセンス核酸および「機能障害性」（すなわち、p 75 シグナル伝達経路における伝達因子（ポリペプチドである場合）に対するコード配列のコード配列内における異種挿入に起因する）の核酸（例えば、RNAi）の投与は、相同組換えによる p 75 シグナル伝達経路における伝達因子の「ノックアウト」内在性機能に利用される（例えば、Capecci (1989) Science 244, 1288-1292 を参照のこと）；あるいは(v) p 75 シグナル伝達経路における伝達因子とその結合パートナーとの間の相互作用を調節する因子（すなわち、インヒビター、アゴニストおよびアンタゴニスト（本発明のさらなるペプチド模倣物または本発明のペプチドに特異的な抗体を含む））。

#### 【0483】

レベルまたは生物学的活性の減少（疾患または障害を罹患していない被験体と比較して）によって特徴付けられる疾患または障害は、活性を増加させる（すなわち、アゴニストである）治療剤で処置され得る。活性を上方制御する治療剤は、治療様式または予防様式で投与され得る。利用され得る治療剤としては、限定されないが、p 75 シグナル伝達経路における伝達因子、またはそのアナログ、誘導体、フラグメントまたはホモログ；あるいはバイアベリタビリティを増大させるアゴニストが挙げられる。

#### 【0484】

レベルの増加または減少は、ペプチドおよび／またはRNAを定量することによって、患者組織サンプル（例えば、生検組織から）を得てRNAまたはペプチドのレベル、発現したペプチド（またはp 75 シグナル伝達経路における伝達因子のmRNA）の構造および／または活性に関してインビトロで上記サンプルをアッセイすることによって、容易に検出され得る。当該分野で周知の方法としては、限定されないが、免疫アッセイ（例えば、ウエスタンブロット分析、免疫沈降後のドデシル硫酸ナトリウム（SDS）ポリアクリルアミドゲル電気泳動、免疫組織化学などによって）、および／またはmRNAの発現を検出するためのハイブリダイゼーションアッセイ（例えば、ノーザンアッセイ、ドットブロット、インサイチュハイブリダイゼーションなど）が挙げられる。

#### 【0485】

本発明はまた、p 75 シグナル伝達経路における伝達因子の発現または少なくとも1つのp 75 シグナル伝達経路における伝達因子の活性を調節する薬剤を被験体に投与することによって、被験体において、異常なp 75 シグナル伝達経路における伝達因子の発現またはp 75 シグナル伝達経路における伝達因子の活性に関連する疾患または状態を予防するための方法を提供する。異常なp 75 シグナル伝達経路における伝達因子の発現またはp 75 シグナル伝達経路における伝達因子の活性によって引き起こされるかまたは寄与される疾患に対するリスクのある被験体は、例えば、本明細書中に記載されるような診断アッセイまたは予後アッセイのいずれかまたは組み合わせによって同定され得る。予防剤の投与は、p 75 シグナル伝達経路における伝達因子の異常に特徴的な症状の出現の前に行い得、その結果、疾患または障害が予防されるか、またはその進行を遅らせる。p 75 シグナル伝達経路における伝達因子の異常の型に基づいて、例えば、p 75 シグナル伝達経路における伝達因子のアゴニスト薬剤またはp 75 シグナル伝達経路における伝達因子のアンタゴニスト薬剤が、被験体を処置するために使用され得る。適切な薬剤は、本明細書中で記載されるスクリーニングアッセイに基づいて決定され得る。

#### 【0486】

本発明はまた、治療目的のためのp 75 シグナル伝達経路における伝達因子の発現または活性を調節する方法に関する。本発明の調節法は、細胞を、細胞と関連するp 75 シグナル伝達経路における伝達因子の活性の1つ以上の活性を調節する薬剤と接触させる工程を包含する。p 75 シグナル伝達経路における伝達因子の活性を調節する薬剤は、本明細

書中で記載されるような薬剤であり得、例えば、核酸またはタンパク質、p75シグナル伝達経路における伝達因子の天然に存在する同族リガンド、ペプチド、p75シグナル伝達経路における伝達因子のペプチド模倣物、または他の低分子であり得る。1つの実施形態において、薬剤は、1つ以上のp75シグナル伝達経路における伝達因子の活性を刺激する。このような刺激剤の例としては、活性p75シグナル伝達経路における伝達因子および細胞中に導入されたp75シグナル伝達経路における伝達因子をコードする核酸分子が挙げられる。別の実施形態において、薬剤は、1つ以上のp75シグナル伝達経路における伝達因子活性を阻害する。このような阻害剤の例としては、アンチセンスp75シグナル伝達経路における伝達因子核酸分子および抗(p75シグナル伝達経路における伝達因子)抗体が挙げられる。これらの調節方法は、インビトロで(例えば、細胞を薬剤とともに培養することによって)、あるいはインビボで(例えば、薬剤を被験体に投与することによって)実行され得る。このように、本発明は、p75シグナル伝達経路における伝達因子(例えば、ポリペプチド)またはそれをコードする核酸分子の異常発現または異常活性によって特徴付けられる疾患または障害に悩まされる個々を処置する方法を提供する。1つの実施形態において、本方法は、薬剤(例えば、本明細書に記載されるスクリーニングアッセイによって同定される薬剤)、またはp75シグナル伝達経路における伝達因子発現またはp75シグナル伝達経路における伝達因子活性を調節する(例えば、上方制御または下方制御する)薬剤の組み合わせを投与する工程を包含する。別の実施形態において、本方法は、減少したp75シグナル伝達経路における伝達因子発現もしくは活性または異常なp75シグナル伝達経路における伝達因子発現もしくは活性を補うための治療として、p75シグナル伝達経路における伝達因子またはそれをコードする核酸分子を投与する工程を包含する。

#### 【0487】

##### (遺伝子治療)

特定の実施形態において、本発明の正常な遺伝子の核酸配列、抗体またはその機能的誘導体をコードする配列を含む核酸は、本発明のポリペプチドの異常な発現および/または活性に関連した疾患または障害を処置、阻害または予防するために、遺伝子治療の目的で投与される。遺伝子治療とは、発現されたか、または発現可能な核酸の、被験体への投与により行われる治療をいう。本発明のこの実施形態において、核酸は、それらのコードされたタンパク質を産生し、そのタンパク質は治療効果を媒介する。

#### 【0488】

当該分野で利用可能な遺伝子治療のための任意の方法が、本発明に従って使用され得る。例示的な方法は、以下のとおりである。

#### 【0489】

遺伝子治療の方法の一般的な概説については、Goldspielら, *Clinical Pharmacy* 12:488-505 (1993); WuおよびWu, *Biotherapy* 3:87-95 (1991); Tolstoshev, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32:573-596 (1993); Mulligan, *Science* 260:926-932 (1993); ならびにMorganおよびAnderson, *Ann. Rev. Biochem.* 62:191-217 (1993); May, *TIBTECH* 11(5):155-215 (1993)を参照のこと。遺伝子治療において使用される一般的に公知の組換えDNA技術は、Ausubelら(編), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY (1993); およびKriegler, *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*, Stockton Press, NY (1990)に記載される。

#### 【0490】

したがって、本発明では、Pep5、PKC、p75、Rho GDI、MAG、p21、Rho、Rhoキナーゼまたはその改変体もしくはフラグメント、あるいはこれらを

調節する因子などをコードする核酸分子を用いた遺伝子治療が有用であり得る。

【0491】

本明細書において「形質」および「表現型」という用語は、本明細書では同義に用いられ、生物の可視的な性質、検出可能な性質またはこれ以外の場合における測定可能な性質すべてを意味するものであり、一例として疾患の徴候または疾患に対する感受性があげられる。本明細書では通常、「形質」または「表現型」という用語は、乳房に関する疾患（例えば、乳がん）、肥満または肥満に関連した障害、特に、アテローム性動脈硬化症、インスリン抵抗性、高血圧症、II型糖尿病の肥満個体における細小血管障害、II型糖尿病の肥満個体における細小血管障害に関連した眼病変、またはII型糖尿病の肥満個体における細小血管障害に関連した腎病変の症状またはこれらに対する罹患性を示すときに用いられ得る。

【0492】

本明細書において「遺伝子型」という用語は、ある生物個体の遺伝子の構成をいい、しばしば個体または試料中に存在する対立遺伝子を意味することがある。試料または個体の「遺伝子型を判定する」という表現は、個体の特定の遺伝子の配列を解析することを包含する。

【0493】

本明細書において「多型」という用語は、異なるゲノムまたは個体間で2以上の選択的ゲノム配列または対立遺伝子が出現することを示すために用いられる。「多型(の)」という表現は、特定のゲノム配列の2以上の変異体が個体群に見出される可能性がある状態を示す。「多型部位」は、そのような変異が発生する遺伝子座である。単一ヌクレオチド多型(SNPs)は、多型部位で1つのヌクレオチドが別のヌクレオチドに置換されたものである。1つのヌクレオチドの欠失または1つのヌクレオチドの挿入によっても単一ヌクレオチド多型が生じる。本明細書において「単一ヌクレオチド多型」は、1つのヌクレオチドの置換を示すものであることが好ましい。一般に、異なる個体間では、多型部位を2つの異なるヌクレオチドが占めている場合がある。本発明では、p75、RhogD、MAG、Rhok、PKC、Rhokinaseなどの多型もまた、神経疾患に関連すると考えられることから、1つの実施形態では、このような多型の分析によって同定された対立遺伝子を用いることが神経の、再生、予防、診断、治療または予後に有効であり得る。

【0494】

本明細書中で使用され、かつ、当該分野で理解されるように、用語「合成(synthesis)」または「合成する(synthesize)」とは、酵素的方法とは対照的に、純粋に化学的に生成された化学物質（例えば、ポリヌクレオチド、ポリペプチドなど）をいう。従って、「全体が」(globally)合成された化学物質（例えば、ポリヌクレオチド、有機低分子、ポリペプチドなど）は、その全体が化学的手段によって生成され、そして「部分的に」合成された化学物質（例えば、ポリヌクレオチド、ポリペプチドなど）は、その得られた化学物質（例えば、ポリヌクレオチド、ポリペプチドなど）の一部分のみが化学的手段によって生成された化学物質（例えば、ポリヌクレオチド、ポリペプチドなど）を包含する。

【0495】

本明細書において使用される用語「領域」によって、生体分子の一次構造の物理的に連続した部分を意味する。タンパク質の場合、領域は、そのタンパク質のアミノ酸配列の連続した部分によって定義される。用語「ドメイン」は、本明細書中で、生体分子の既知の機能または推測されている機能に寄与する、その生体分子の構造部分をいうものとして定義される。ドメインは、領域またはその部分と同じ広がりをも有し得；ドメインはまた、その領域の全てまたは一部に加えて、特定の領域と区別される生体分子の一部を組み込み得る。本発明のp75シグナル伝達におけるタンパク質のドメインの例としては、シグナルペプチド、細胞外（すなわち、N末端）ドメイン、ロイシンリッチ反復ドメインが挙げられるが、これらに限定されない。

【0496】

**(治療活性または予防活性の証明)**

本発明の化合物または薬学的組成物は、好ましくは、ヒトでの使用の前にインビトロで、そして次いでインビボで、所望の治療活性または予防活性について試験される。例えば、化合物または薬学的組成物の、治療有用性または予防有用性を証明するためのインビトロアッセイとしては、細胞株または患者組織サンプルに対する化合物の効果が挙げられる。細胞株および／または組織サンプルに対する化合物または組成物の効果は、当業者に公知である技術（細胞溶解アッセイが挙げられるがこれらに限定されない）を利用して決定され得る。本発明に従って、特定の化合物の投与が示されるか否かを決定するために用いられ得るインビトロアッセイとしては、インビトロ細胞培養アッセイが挙げられ、このアッセイでは、患者組織サンプルが培養物において増殖し、そして化合物に曝されるか、そうでなければ化合物が投与され、そして、組織サンプルに対するそのような化合物の効果が観察される。

**【0497】****(治療的／予防的な投与および組成物)**

本発明は、被験体への有効量の本発明の化合物または薬学的組成物の投与による処置、阻害および予防の方法を提供する。好ましい局面において、化合物は実質的に精製されたものであり得る（例えば、その効果を制限するかまたは望ましくない副作用を生じる物質が実質的に存在しない状態が挙げられる）。

**【0498】**

本明細書において「診断、予防、処置または予後上有効な量」とは、それぞれ、診断、予防、処置（または治療）または予後において、医療上有効であると認められる程度の量をいう。このような量は、当該分野において周知の技法を用いて当業者が種々のパラメータを参酌しながら決定することができる。

**【0499】**

本発明が対象とする動物は、神経系または類似の系を有するものであれば、どの生物（例えば、動物（たとえば、脊椎動物、無脊椎動物））でもよい。好ましくは、脊椎動物（たとえば、メクラウナギ類、ヤツメウナギ類、軟骨魚類、硬骨魚類、両生類、爬虫類、鳥類、哺乳動物など）であり、より好ましくは、哺乳動物（例えば、単孔類、有袋類、貧歯類、皮翼類、翼手類、食肉類、食虫類、長鼻類、奇蹄類、偶蹄類、管歯類、有鱗類、海牛類、クジラ目、霊長類、齧歯類、ウサギ目など）であり得る。例示的な被験体としては、例えば、ウシ、ブタ、ウマ、ニワトリ、ネコ、イヌなどの動物が挙げられるがそれらに限定されない。さらに好ましくは、霊長類（たとえば、チンパンジー、ニホンザル、ヒト）由来の細胞が用いられる。最も好ましくはヒト由来の細胞が用いられる。

**【0500】**

本発明の核酸分子またはポリペプチドが医薬として使用される場合、そのような組成物は、薬学的に受容可能なキャリアなどをさらに含み得る。本発明の医薬に含まれる薬学的に受容可能なキャリアとしては、当該分野において公知の任意の物質が挙げられる。

**【0501】**

そのような適切な処方材料または薬学的に受容可能なキャリアとしては、抗酸化剤、保存剤、着色料、風味料、および希釈剤、乳化剤、懸濁化剤、溶媒、フィラー、増量剤、緩衝剤、送達ビヒクル、希釈剤、賦形剤および／または薬学的アジュバントが挙げられるがそれらに限定されない。代表的には、本発明の医薬は、Pep5、PKC、IP3、p75、RhogDI、MAG、p21、Rhog、Rhokinaseまたはその改変体もしくはフラグメントなどのポリペプチドまたはポリヌクレオチド、またはその改変体もしくは誘導体、あるいはそれらの調節因子を、1つ以上の生理的に受容可能なキャリア、賦形剤または希釈剤とともに含む組成物の形態で投与される。例えば、適切なビヒクルは、注射用水、生理的溶液、または人工脳脊髄液であり得、これらには、非経口送達のための組成物に一般的な他の物質を補充することが可能である。

**【0502】**

本明細書で使用される受容可能なキャリア、賦形剤または安定化剤は、レシピエントに



対して非毒性であり、そして好ましくは、使用される投薬量および濃度において不活性であり、例えば、リン酸塩、クエン酸塩、または他の有機酸；アスコルビン酸、 $\alpha$ -トコフェロール；低分子量ポリペプチド；タンパク質（例えば、血清アルブミン、ゼラチンまたは免疫グロブリン）；親水性ポリマー（例えば、ポリビニルピロリドン）；アミノ酸（例えば、グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニンまたはリジン）；モノサッカリド、ジサッカリドおよび他の炭水化物（グルコース、マンノース、またはデキストリンを含む）；キレート剤（例えば、EDTA）；糖アルコール（例えば、マンニトールまたはソルビトール）；塩形成対イオン（例えば、ナトリウム）；ならびに／あるいは非イオン性表面活性化剤（例えば、Tween、プルロニック（pluronic）またはポリエチレングリコール（PEG））などが挙げられるがそれらに限定されない。

#### 【0503】

例示の適切なキャリアとしては、中性緩衝化生理食塩水、または血清アルブミンと混合された生理食塩水が挙げられる。好ましくは、その生成物は、適切な賦形剤（例えば、スクロース）を用いて凍結乾燥剤として処方される。他の標準的なキャリア、希釈剤および賦形剤は所望に応じて含まれ得る。他の例示的な組成物は、pH 7.0-8.5のTris緩衝剤またはpH 4.0-5.5の酢酸緩衝剤を含み、これらは、さらに、ソルビトールまたはその適切な代替物を含み得る。

#### 【0504】

以下に本発明の医薬組成物の一般的な調製法を示す。なお、動物薬組成物、医薬部外品、水産薬組成物、食品組成物および化粧品組成物等についても公知の調製法により製造することができる。

#### 【0505】

本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチドなどは、薬学的に受容可能なキャリアと配合し、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、粉剤、座剤等の固形製剤、またはシロップ剤、注射剤、懸濁剤、溶液剤、スプレー剤等の液状製剤として経口または非経口的に投与することができる。薬学的に受容可能なキャリアとしては、上述のように、固形製剤における賦形剤、滑沢剤、結合剤、崩壊剤、崩壊阻害剤、吸収促進剤、吸着剤、保湿剤、溶解補助剤、安定化剤、液状製剤における溶剤、溶解補助剤、懸濁化剤、等張化剤、緩衝剤、無痛化剤等が挙げられる。また、必要に応じ、防腐剤、抗酸化剤、着色剤、甘味剤等の製剤添加物を用いることができる。また、本発明の組成物には本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチドなど以外の物質を配合することも可能である。非経口の投与経路としては、静脈内注射、筋肉内注射、経鼻、直腸、膣および経皮等が挙げられるがそれらに限定されない。

#### 【0506】

固形製剤における賦形剤としては、例えば、グルコース、ラクトース、スクロース、D-マンニトール、結晶セルロース、デンプン、炭酸カルシウム、軽質無水ケイ酸、塩化ナトリウム、カオリンおよび尿素等が挙げられる。

#### 【0507】

固形製剤における滑沢剤としては、例えば、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸カルシウム、ホウ酸末、コロイド状ケイ酸、タルクおよびポリエチレングリコール等が挙げられるがそれらに限定されない。

#### 【0508】

固形製剤における結合剤としては、例えば、水、エタノール、プロパノール、白糖、D-マンニトール、結晶セルロース、デキストリン、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、デンプン溶液、ゼラチン溶液、ポリビニルピロリドン、リン酸カルシウム、リン酸カリウム、およびシェラック等が挙げられる。

#### 【0509】

固形製剤における崩壊剤としては、例えば、デンプン、カルボキシメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースカルシウム、カンテン末、ラミナラン末、クロスカルメロースナトリウム、カルボキシメチルスターチナトリウム、アルギン酸ナトリウム、炭酸水素

ナトリウム、炭酸カルシウム、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル類、ラウリル硫酸ナトリウム、デンプン、ステアリン酸モノグリセリド、ラクトースおよび繊維素グリコール酸カルシウム等が挙げられるがそれらに限定されない。

【0510】

固形製剤における崩壊阻害剤の好適な例としては、水素添加油、白糖、ステアリン、カオ脂および硬化油等が挙げられるがそれらに限定されない。

【0511】

固形製剤における吸収促進剤としては、例えば、第四級アンモニウム塩基類およびラウリル硫酸ナトリウム等が挙げられるがそれらに限定されない。

【0512】

固形製剤における吸着剤としては、例えば、デンプン、ラクトース、カオリン、ベントナイトおよびコロイド状ケイ酸等が挙げられるがそれらに限定されない。

【0513】

固形製剤における保湿剤としては、例えば、グリセリン、デンプン等が挙げられるがそれらに限定されない。

【0514】

固形製剤における溶解補助剤としては、例えば、アルギニン、グルタミン酸、アスパラギン酸等が挙げられるがそれらに限定されない。

【0515】

固形製剤における安定化剤としては、例えば、ヒト血清アルブミン、ラクトース等が挙げられるがそれらに限定されない。

【0516】

固形製剤として錠剤、丸剤等を調製する際には、必要により胃溶性または腸溶性物質（白糖、ゼラチン、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレート等）のフィルムで被覆していてもよい。錠剤には、必要に応じ通常の剤皮を施した錠剤、例えば、糖衣錠、ゼラチン被包錠、腸溶被錠、フィルムコーティング錠あるいは二重錠、多層錠が含まれる。カプセル剤にはハードカプセルおよびソフトカプセルが含まれる。座剤の形態に成形する際には、上記に列挙した添加物以外に、例えば、高級アルコール、高級アルコールのエステル類、半合成グリセライド等を添加することができるがそれらに限定されない。

【0517】

液状製剤における溶剤の好適な例としては、注射用水、アルコール、プロピレングリコール、マクロゴール、ゴマ油およびトウモロコシ油等が挙げられる。

【0518】

液状製剤における溶解補助剤の好適な例としては、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール、D-マンニトール、安息香酸ベンジル、エタノール、トリスアミノメタン、コレステロール、トリエタノールアミン、炭酸ナトリウムおよびクエン酸ナトリウム等が挙げられるがそれらに限定されない。

【0519】

液状製剤における懸濁化剤の好適な例としては、ステアリルトリエタノールアミン、ラウリル硫酸ナトリウム、ラウリルアミノプロピオン酸、レシチン、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、モノステアリン酸グリセリン等の界面活性剤、例えば、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロース、ヒドロキシメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース等の親水性高分子等が挙げられるがそれらに限定されない。

【0520】

液状製剤における等張化剤の好適な例としては、塩化ナトリウム、グリセリン、D-マンニトール等が挙げられるがそれらに限定されない。

【0521】

液状製剤における緩衝剤の好適な例としては、リン酸塩、酢酸塩、炭酸塩およびクエン酸塩等の緩衝液等が挙げられるがそれらに限定されない。

【0522】

液状製剤における無痛化剤の好適な例としては、ベンジルアルコール、塩化ベンザルコニウムおよび塩酸プロカイン等が挙げられるがそれらに限定されない。

【0523】

液状製剤における防腐剤の好適な例としては、パラオキシ安息香酸エステル類、クロロブタノール、ベンジルアルコール、2-フェニルエチルアルコール、デヒドロ酢酸、ソルビン酸等が挙げられるがそれらに限定されない。

【0524】

液状製剤における抗酸化剤の好適な例としては、亜硫酸塩、アスコルビン酸、 $\alpha$ -トコフェロールおよびシステイン等が挙げられるがそれらに限定されない。

【0525】

注射剤として調製する際には、液剤および懸濁剤は殺菌され、かつ血液と等張であることが好ましい。通常、これらは、バクテリア保留フィルター等を用いるろ過、殺菌剤の配合または照射によって無菌化する。さらにこれらの処理後、凍結乾燥等の方法により固形物とし、使用直前に無菌水または無菌の注射用希釈剤（塩酸リドカイン水溶液、生理食塩水、ブドウ糖水溶液、エタノールまたはこれらの混合溶液等）を添加してもよい。

【0526】

さらに、必要ならば、医薬組成物は、着色料、保存剤、香料、矯味矯臭剤、甘味料等、ならびに他の薬剤を含んでもよい。

【0527】

本発明の医薬は、経口的または非経口的に投与され得る。あるいは、本発明の医薬は、静脈内または皮下で投与され得る。全身投与されるとき、本発明において使用される医薬は、発熱物質を含まない、薬学的に受容可能な水溶液の形態であり得る。そのような薬学的に受容可能な組成物の調製は、pH、等張性、安定性などを考慮することにより、当業者は、容易に行うことができる。本明細書において、投与方法は、経口投与、非経口投与（例えば、静脈内投与、筋肉内投与、皮下投与、皮内投与、粘膜投与、直腸内投与、膣内投与、患部への局所投与、皮膚投与など）であり得る。そのような投与のための処方物は、任意の製剤形態で提供され得る。そのような製剤形態としては、例えば、液剤、注射剤、徐放剤が挙げられる。

【0528】

本発明の医薬は、必要に応じて生理学的に受容可能なキャリア、賦型剤または安定化剤（日本薬局方第14版、その追補またはその最新版、Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Edition, A. R. Genaro, ed., Mack Publishing Company, 1990などを参照）と、所望の程度の純度を有する糖鎖組成物とを混合することによって、凍結乾燥されたケーキまたは水溶液の形態で調製され保存され得る。

【0529】

様々な送達系が公知であり、そして本発明の化合物を投与するために用いられ得る（例えば、リポソーム、微粒子、マイクロカプセルなど）。導入方法としては、皮内、筋内、腹腔内、静脈内、皮下、鼻腔内、硬膜外、および経口経路が挙げられるがそれらに限定されない。化合物または組成物は、任意の好都合な経路により（例えば、注入またはボラス注射により、上皮または粘膜内層（例えば、口腔粘膜、直腸粘膜および腸粘膜など）を通しての吸収により）投与され得、そして他の生物学的に活性な薬剤と一緒に投与され得る。投与は、全身的または局所的であり得る。さらに、本発明の薬学的化合物または組成物を、任意の適切な経路（脳室内注射および髄腔内注射を包含し；脳室内注射は、例えば、Ommaya リザーバのようなリザーバに取り付けられた脳室内カテーテルにより容易にされ得る）により中枢神経系に導入することが望まれ得る。例えば、吸入器または噴霧器の使用、およびエアロゾル化剤を用いた処方により、肺投与もまた使用され得る。

## 【0530】

特定の実施形態において、本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチドまたは組成物を、処置の必要な領域（例えば、中枢神経、脳など）に局所的に投与することが望まれ得る；これは、制限する目的ではないが、例えば、手術中の局部注入、局所適用（例えば、手術後の創傷包帯との組み合わせ）により、注射により、カテーテルにより、坐剤により、またはインプラント（このインプラントは、シアラストック（sialastic）膜のような膜または繊維を含む、多孔性、非多孔性、または膠様材料である）により達成され得る。好ましくは、抗体を含む本発明のタンパク質を投与する際、タンパク質が吸収されない材料を使用するために注意が払われなければならない。

## 【0531】

別の実施形態において、化合物または組成物は、小胞、特に、リポソーム中に封入された状態で送達され得る（Langer, Science 249:1527-1533 (1990) ; Treatら, Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer, Lopez-BeresteinおよびFidler (編), Liss, New York, 353~365頁 (1989) ; Lopez-Berestein, 同書317~327頁を参照のこと ; 広く同書を参照のこと）。

## 【0532】

さらに別の実施形態において、化合物または組成物は、制御された徐放系中で送達され得る。1つの実施形態において、ポンプが用いられ得る（Langer (前出) ; Sefton, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201 (1987) ; Buchwaldら, Surgery 88:507 (1980) ; Saudekら, N. Engl. J. Med. 321:574 (1989) を参照のこと）。別の実施形態において、高分子材料が用いられ得る（Medical Applications of Controlled Release, LangerおよびWise (編), CRC Pres., Boca Raton, Florida (1974) ; Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, SmolenおよびBall (編), Wiley, New York (1984) ; RangerおよびPeppas, J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61 (1983) を参照のこと ; Levyら, Science 228:190 (1985) ; Durinら, Ann. Neurol. 25:351 (1989) ; Howardら, J. Neurosurg. 71:105 (1989) もまた参照のこと）。

## 【0533】

さらに別の実施形態において、制御された徐放系は、治療標的、即ち、脳の近くに置かれ得、従って、全身用量の一部のみを必要とする（例えば、Goodson, Medical Applications of Controlled Release, (前出), 第2巻, 115~138頁 (1984) を参照のこと）。

## 【0534】

他の制御された徐放系は、Langerにより総説において議論される（Science 249:1527-1533 (1990)）。

## 【0535】

本発明の処置方法において使用される組成物の量は、使用目的、対象疾患（種類、重篤度など）、患者の年齢、体重、性別、既往歴、細胞の形態または種類などを考慮して、当業者が容易に決定することができる。本発明の処置方法を被験体（または患者）に対して施す頻度もまた、使用目的、対象疾患（種類、重篤度など）、患者の年齢、体重、性別、既往歴、および治療経過などを考慮して、当業者が容易に決定することができる。頻度としては、例えば、毎日-数ヶ月に1回（例えば、1週間に1回-1ヶ月に1回）の投与が挙げられる。1週間-1ヶ月に1回の投与を、経過を見ながら施すことが好ましい。

## 【0536】

本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチドなどの投与量は、被験体の年齢、体重、症状または投与方法などにより異なり、特に限定されないが、通常成人1日あたり、経口投与の場合、0.01mg~10gであり、好ましくは、0.1mg~1g、1mg~100mg、0.1mg~10mgなどであり得る。非経口投与の場合、0.01mg~1gであり、好ましくは、0.01mg~100mg、0.1mg~100mg、1mg~100mg、0.1mg~10mgなどであり得る。

#### 【0537】

本明細書中、「投与する」とは、本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチド、因子などまたはそれを含む医薬組成物を、単独で、または他の治療剤と組み合わせて、生物の細胞、組織または生体に取り込むことを意味する。組み合わせは、例えば、混合物として同時に、別々であるが同時にもしくは並行して；または逐次的にかのいずれかで投与され得る。これは、組み合わせられた薬剤が、治療混合物としてともに投与される提示を含み、そして組み合わせた薬剤が、別々であるが同時に（例えば、同じ個体へ別々の静脈ラインを通じての場合）投与される手順もまた含む。「組み合わせ」投与は、第1に与えられ、続いて第2に与えられる化合物または薬剤のうちの1つを別々に投与することをさらに含む。

#### 【0538】

異常な状態はまた、生物へのシグナル伝達経路に異常を有する細胞の群に化合物を投与することによって予防または処置され得る。次いで、化合物を投与することの生物機能に対する効果が、モニターされ得る。この生物は、好ましくは、マウス、ラット、ウサギ、モルモット、またはヤギ、より好ましくは、サル（monkeyまたはape）、および最も好ましくは、ヒトである。これらの非ヒト動物の特定の因子に関するモニターにより、ヒトにおけるその因子の効果を蓋然性を持って推定することができる。

#### 【0539】

本明細書において「指示書」は、本発明の医薬などを投与する方法または診断する方法などを医師、患者など投与を行う人、診断する人（患者本人であり得る）に対して記載したものである。この指示書は、本発明の診断薬、医薬などを投与する手順を指示する文言が記載されている。この指示書は、本発明が実施される国の監督官庁（例えば、日本であれば厚生労働省、米国であれば食品医薬品局（FDA）など）が規定した様式に従って作成され、その監督官庁により承認を受けた旨が明記される。指示書は、いわゆる添付文書（package insert）であり、通常は紙媒体で提供されるが、それに限定されず、例えば、電子媒体（例えば、インターネットで提供されるホームページ（ウェブサイト）、電子メール、SMS、ボイスメール、インスタントメッセージ）のような形態でも提供され得る。

#### 【0540】

本発明の方法による治療の終了の判断は、商業的に利用できるアッセイもしくは機器使用による標準的な臨床検査室の結果またはPep5、PKC、IP<sub>3</sub>、p75、RhogDI、MAG、Gtlb、p21、Rho、Rhoキナーゼなどに関連する疾患（例えば、神経疾患）に特徴的な臨床症状の消滅によって支持され得る。治療は、Pep5、PKC、IP<sub>3</sub>、p75、RhogDI、MAG、Gtlb、p21、Rho、Rhoキナーゼなどに関連する疾患（例えば、神経疾患）の再発により再開することができる。

#### 【0541】

本発明はまた、本発明の医薬組成物の1つ以上の成分を満たした1つ以上の容器を備える薬学的パックまたはキットを提供する。医薬品または生物学的製品の製造、使用または販売を規制する政府機関が定めた形式の通知が、このような容器に任意に付属し得、この通知は、ヒトへの投与に対する製造、使用または販売に関する政府機関による承認を表す。

#### 【0542】

血漿、腫瘍および主要器官中での薬物および代謝産物の血漿半減期および体内分布はまた、障害を阻害するのに最も適切な薬物の選択を容易にするように決定され得る。このような測定が行われ得る。例えば、HPLC分析は、薬物で処置された動物の血漿において

行われ得、放射線標識された化合物の位置が、X線、CATスキャンおよびMRIのような検出方法を用いて決定され得る。スクリーニングアッセイにおいて強力な阻害活性を示すが、薬物動態学的特徴が不十分な化合物は、化学構造の変更や再試験によって最適化され得る。この点について、良好な薬物動態学的特徴を示す化合物が、モデルとして使用され得る。

#### 【0543】

毒性研究はまた、血液細胞組成物を測定することによって行われ得る。例えば、毒性研究は、以下のような適切な動物モデルにおいて行われ得る：(1) 化合物がマウスに投与される（未処置のコントロールマウスもまた、使用されるべきである）；(2) 各々の処置群中の1匹のマウスから尾静脈を介して血液サンプルを周期的に得る；そして(3) 上記サンプルを、赤血球および白血球の数、血液細胞組成物ならびにリンパ球と多形核細胞との割合について分析する。各々の投薬レジメンについての結果とコントロールとの比較は、毒性が存在するか否かを示す。

#### 【0544】

各々の毒性研究の終了の際に、動物を屠殺することによって、さらなる研究を行い得る（好ましくは、American Veterinary Medical Association guidelines Report of the American Veterinary Medical Assoc. Panel on Euthanasia, (1993) J. Am. Vet. Med. Assoc. 202:229-249に従う）。次いで、各処置群からの代表的な動物が、転移、異常な病気または毒性の直接的な証拠のために全体的な検屍によって試験され得る。組織における全体の異常が記載され、組織が組織学的に試験される。体重の減少または血液成分の減少を引き起こす化合物は、主要な器官に対する有害作用を有する化合物と同様に好ましくない。一般的に、有害作用が大きいほど、その化合物は好ましくない。

#### 【0545】

(詳細な説明)

本発明者らの研究によって、p75とRho GDIとの会合が、MAGおよびNogoによって増強されることが実証された。p75は、インビトロにおいてRho GDIからRho Aを離脱させる能力を有するので、p75を介したMAGまたはNogoによるRho Aの活性化は、少なくとも部分的に、Rho GDI置換に起因し得る。Rho GDIからのRhoの離脱は、グアニンヌクレオチド交換因子による活性化およびRhoのGTP結合形態の膜会合を可能にする重要な工程である。p75自体は、グアニンヌクレオチド交換のプロセスを媒介し得ないので、いくつかのRhoグアニンヌクレオチド交換因子は、p75と協同し得る（これは、将来取り組まれるべき論点のうちの1つである）。別のRho GDI置換因子であるエズリン/ラディキシン/モエシンもまた、Swiss 3T3細胞中でRho Aの活性化を誘導し、このことは、p75がRho Aを活性化するという本発明者らの知見に類似することに注意すること。

#### 【0546】

p75が、発生段階の間の軸索誘導または軸索成長において重要な役割を有するという証拠は増大している(Dechant, G. & Barde, Y. A. Nat Neurosci. 5, 1131-1136 (2002))。p75に変異を保有するマウスの脊髄運動ニューロンまたは前肢運動ニューロンからの軸索伸展は、インビボで有意に妨害される(Yamashita, T., Tucker, K. L. & Barde, Y. A. Neuron 24, 585-593 (1999)、Bentley, C. A. & Lee K, F. J Neurosci. 20, 7706-7715 (2000))。この表現型は、p75へのリガンド結合に起因し得る。なぜなら、p75を発現するがTrkAは発現しないヒヨコ毛様体ニューロンは、NGFに応答して神経突起を伸長させるからである。これらの観察と対照的に、異常な軸索伸長が、p75に変異を保有するマウスにおいて、軸索が通常成長しないミエリンに富む領域中に観察されている(Walsh, G. S., Krol, K. M., Crutcher, K. A. & Kawaja, M. D. J.

Neurosci. 19, 4155-4168 (1999))。これらの知見と一致して、現在までに同定された神経突起伸展のミエリン由来インヒビターの全てが、p75に依存する成長を阻害している(Yamashita, T., Higuchi, H. & Tohyama, M., J. Cell Biol. 157, 565-570 (2002)、Wang, K. C. & Kim, J. A., Sivasankaran, R., Segal, R. & He, Z., Nature 420, 74-78 (2002)、Wong, S. T. et al. Nat Neurosci. 5, 1302-1308 (2002))。本発明者らの知見は、これらの効果が、p75のRho GDI置換活性から生じ得るということを示唆する。さらに、p75発現ニューロンの軸索先導の誤りは、p75に変異を保有するマウス中で観察される表現型の間で顕著である(交感神経軸索および皮質サブプレート軸索の誤った標的化を含む)(Lee, K. F., Bachman, K., Landis, S. & Jaenisch, R. Science 263, 1447-1449 (1994)、McQuillen, P. S., DeFreitas, M. F., Zada, G. & Shatz, C. J., J Neurosci. 22, 3580-3593 (2000))。Rhoは、発生段階における軸索先導の調節に関与しているようなので、p75の非存在下における誤った標的化は、Rho活性の適切な調節の失敗に起因し得る可能性があり得る。興味深いことに、近年の報告は、Rac1の下流経路の空間的な活性化および時間的な活性化におけるRho GDIの役割を示唆している(Del Pozo, M. A. et al., Nat Cell Biol. 4, 232-239 (2002))。Rho GDIはRac1と会合し、そしてエフェクター結合をブロックするが、インテグリンが局在化する特定の領域におけるRho GDIからのRac1の離脱は、Rac1がそのエフェクターに結合することを可能にする。従って、Rho GDIは、Rho GTPase-エフェクター相互作用の空間的に制限された調節を与えることが示唆されている。さらなる研究において、Rho GDIによって調節されるRhoシグナル伝達の空間的な制御が、軸索先導に関与し得るという仮説を試験することは興味深い。

#### 【0547】

p75の短いアイソフォーム(これは、細胞外リガンド結合ドメイン中の4つのシステムインリッチリピートのうち3つを欠くが、インタクトな細胞内ドメインを有する)が見出されている(von Schack et al., Nat Neurosci. 4, 977-978 (2001))。p75遺伝子の第3エキソンの破壊が標的化されたマウス(Lee, K. F. et al. Cell 69, 737-749 (1992))由来の細胞は、この短い形態のp75を発現するが、阻害分子と無反応である(Yamashita, T., Higuchi, H. & Tohyama, M. J. Cell Biol. 157, 565-570 (2002)、Wang, K. C. & Kim, J. A., Sivasankaran, R., Segal, R. & He, Z. Nature 420, 74-78 (2002)、Wong, S. T. et al. Nat Neurosci. 5, 1302-1308 (2002))。本発明者らのデータによって、p75の短いアイソフォームを発現するが全長p75は発現しないニューロンの神経突起伸展にPep5が影響を与えなかったことが示されたので(図5b)、短いアイソフォームは、神経突起伸展の調節因子として作用し得ない。

#### 【0548】

そのような短いアイソフォームは、細胞内ドメインを構成する成分であることから、好ましい実施形態において、細胞外ドメインを含む成分を含むものが好ましいp75として使用され得る。

#### 【0549】

成体の中枢神経系の軸索は、損傷後に限定された量の再生しか可能ではないこと、ならびに所望されない環境は、再生の欠如に主要な役割を果たすということが、ここで十分に確立された。軸索成長阻害効果のほとんどは、ミエリンと関連する。ミエリン由来インヒビターの同定によって、生物学的活性の分子機構に関する本発明者らの認識が確認された

。従って、阻害シグナルを克服するための戦略を探索することが、ここで重要な問題となる。本発明者らは、Pep5が、ミエリン由来インヒビターによって媒介される作用を特異的に阻害するようであることに注目した。なぜなら、Pep5は、海馬ニューロンからの神経突起伸展のNGF誘導性増進も（データには示さない）、100 ng/ml BDNFで処理した上頸神経節ニューロンの細胞死も（データには示さない）阻害しなかったからである。ミエリン関連インヒビター効果の特異的な阻害は、中枢神経系への損傷に対する実質的な治療剤を提供し得る。

#### 【0550】

いくつかのミエリン由来タンパク質が、成体脊椎動物のCNS中の軸索再生を妨害する中枢神経系（CNS）ミエリンの成分であると同定されている。RhoAの活性化は、これらのタンパク質のシグナル伝達機構の重要な部分であることが示されている。ここで本発明者らは、これらのタンパク質が軸索伸展を促進するかまたは阻害するかを決定する、さらなるシグナルを報告する。ミエリン結合糖タンパク質（MAG）およびNogoは、細胞内Ca<sup>2+</sup>上昇およびPKCの活性化を誘発し、これはおそらく、Giによって媒介される。MAGまたはNogoによる軸索伸展阻害および成長円錐の破壊は、PKCの阻害によって軸索伸長および成長円錐の拡大に変わり得るが、イノシトール1, 4, 5-三リン酸（IP<sub>3</sub>）の阻害によっては変わらない。逆に、MAGによって促進される未成熟ニューロンの軸索成長は、IP<sub>3</sub>を阻害することによって破壊される。RhoAの活性化は、PKC非依存性である。従って、PKCとIP<sub>3</sub>との間のバランスは、ミエリン由来タンパク質による軸索再生の双方向調節に対して重要であり得る。

#### 【0551】

（好ましい実施形態の説明）

以下に本発明の好ましい実施形態を説明する。以下に提供される実施形態は、本発明のよりよい理解のために提供されるものであり、本発明の範囲は以下の記載に限定されるべきでないことが理解される。従って、当業者は、本明細書中の記載を参酌して、本発明の範囲内で適宜改変を行うことができることは明らかである。

#### 【0552】

（Pep5のポリペプチド形態）

1つの局面において、本発明は、Pep5ポリペプチドを含む神経を再生するための組成物、およびPep5ポリペプチドを含む神経疾患、神経障害または神経の状態の、処置、予防、診断または予後のための組成物を提供する。ここで、再生、診断、予防、処置または予後上有効な量は、本明細書の開示に基づいて、当該分野において周知の技法を用いて当業者が種々のパラメータを参酌しながら決定することができ、そのような量を決定するためには、例えば、使用目的、対象疾患（種類、重篤度など）、患者の年齢、体重、性別、既往歴、細胞の形態または種類などを考慮して、当業者が容易に決定することができる（神経内科治療ガイド、小川紀雄著、中外医学社 1994を参照）。本発明では、神経の再生が、p75シグナル伝達経路を遮断することによって（Pep5による）、神経突起伸展の阻害が破壊されることによることが明らかになった。このようなシグナル伝達経路の遮断による神経再生の効果は従来知られておらず、したがって、本発明は、従来技術より優れた効果を示す。

#### 【0553】

1つの実施形態において、本発明において用いられるPep5、またはそのフラグメントもしくは改変体は、（a）配列番号1に記載の核酸配列もしくはそのフラグメントによってコードされる、ポリペプチド；（b）配列番号2に記載のアミノ酸配列またはそのフラグメントからなる、ポリペプチド；（c）配列番号2に記載のアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも1つの変異を有し、かつ、生物学的活性を有する、ポリペプチド；または（d）（a）～（c）のいずれか1つのポリペプチドに対する相同性が少なくとも70%であるアミノ酸配列を有し、かつ、生物学的活性を有する、ポリペプチド、を含む。

#### 【0554】



1つの好ましい実施形態において、上記(c)における置換、付加および欠失の数は限定されていてもよく、例えば、50以下、40以下、30以下、20以下、15以下、10以下、9以下、8以下、7以下、6以下、5以下、4以下、3以下、2以下であることが好ましい。より少ない数の置換、付加および欠失が好ましいが、生物学的活性を保持する(好ましくは、Pep5と類似するかまたは実質的に同一の活性を有する)限り、多い数であってもよい。

#### 【0555】

別の好ましい実施形態において、上記(d)における上記改変体ポリペプチドが有する生物学的活性としては、例えば、配列番号2に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドまたはそのフラグメントに対して特異的な抗体との相互作用、p75ポリペプチドとの相互作用などが挙げられるがそれらに限定されない。

#### 【0556】

好ましい実施形態において、上記(a)～(c)のいずれか1つのポリペプチドに対する相同性は、少なくとも約80%であり得、より好ましくは少なくとも約90%であり得、さらに好ましくは少なくとも約98%であり得、もっとも好ましくは少なくとも約99%であり得る。

#### 【0557】

本発明のポリペプチドは、通常、少なくとも3の連続するアミノ酸配列を有する。本発明のポリペプチドが有するアミノ酸長は、目的とする用途に適合する限り、どれだけ短くてもよいが、好ましくは、より長い配列が使用され得る。従って、好ましくは、少なくとも4アミノ酸長、より好ましくは少なくとも5アミノ酸長、少なくとも6アミノ酸長、少なくとも7アミノ酸長、少なくとも8アミノ酸長、少なくとも9アミノ酸長、少なくとも10アミノ酸長であってもよい。さらに好ましくは少なくとも15アミノ酸長であり得、なお好ましくは少なくとも20アミノ酸長であり得る。これらのアミノ酸長の下限は、具体的に挙げた数字のほかに、それらの間の数(例えば、11、12、13、14、16など)あるいは、それ以上の数(例えば、21、22、...、30、など)であってもよい。本発明のポリペプチドは、ある因子と相互作用することができる限り、その上限の長さは、配列番号2に示す配列の全長と同一であってもよく、それを超える長さであってもよい。

#### 【0558】

1つの実施形態において、Pep5ポリペプチド、またはそのフラグメントもしくは改変体は、配列番号2のアミノ酸に示す全範囲を含む。より好ましくは、Pep5、またはそのフラグメントもしくは改変体は、配列番号2のアミノ酸全範囲からなることが有利であり得る。

#### 【0559】

1つの実施形態において、処置されるべき神経の疾患、障害または状態は、本明細書において他の場所において記載されており、例えば、アルツハイマー病、脊髄損傷、脳血管障害、脳外傷などを含む。好ましくは、本発明の組成物が対象とする神経の疾患、障害または状態は、アルツハイマー病であり得る。他に好ましい実施形態では、本発明の組成物が対象とする神経の疾患、障害または状態は、脊髄損傷、脳血管障害、脳外傷であり得る。

#### 【0560】

(Pep5の核酸形態)

1つの局面において、本発明は、Pep5ポリペプチドをコードする核酸分子を含む神経を再生するための組成物、およびPep5ポリペプチドをコードする核酸分子を含む神経疾患、神経障害または神経の状態の、処置、予防、診断または予後のための組成物を提供する。ここで、再生、診断、予防、処置または予後上有効な量は、当該分野において周知の技法を用いて当業者が種々のパラメータを参酌しながら決定することができ、そのような量を決定するためには、例えば、使用目的、対象疾患(種類、重篤度など)、患者の年齢、体重、性別、既往歴、細胞の形態または種類などを考慮して、当業者が容易に決定

することができる（神経内科治療ガイド、小川紀雄著、中外医学社 1994を参照）。本発明では、神経の再生が、p 75シグナル伝達経路を遮断することによって（P e p 5による）、神経突起伸展の阻害が破壊されることによることが明らかになった。このようなシグナル伝達経路の遮断による神経再生の効果は従来知られておらず、したがって、本発明は、従来技術より優れた効果を示す。

#### 【0561】

1つの実施形態において、本発明において用いられるP e p 5をコードする核酸分子、またはそのフラグメントもしくは改変体は、（a）配列番号1に記載の塩基配列またはそのフラグメント配列を有するポリヌクレオチド；（b）配列番号2に記載のアミノ酸配列（C F F R G G F F N H N P R Y C）からなるポリペプチドまたはそのフラグメントをコードするポリヌクレオチド；（c）配列番号2に記載のアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が、置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも1つの変異を有する改変体ポリペプチドであって、生物学的活性を有する改変体ポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチド；（d）（a）～（c）のいずれか1つのポリヌクレオチドにストリンジェント条件下でハイブリダイズし、かつ生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；または（e）（a）～（c）のいずれか1つのポリヌクレオチドまたはその相補配列に対する同一性が少なくとも70%である塩基配列からなり、かつ、生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、を含む。

#### 【0562】

1つの好ましい実施形態において、上記（c）における置換、付加および欠失の数は、限定され、例えば、50以下、40以下、30以下、20以下、15以下、10以下、9以下、8以下、7以下、6以下、5以下、4以下、3以下、2以下であることが好ましい。より少ない数の置換、付加および欠失が好ましいが、生物学的活性を保持する（好ましくは、P e p 5と類似するかまたは実質的に同一の活性を有する）限り、多い数であってもよい。

#### 【0563】

別の好ましい実施形態において、上記改変体ポリペプチドが有する生物学的活性としては、例えば、配列番号2に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドまたはそのフラグメントに対して特異的な抗体との相互作用、p 75との相互作用、p 75によるR h o G D Iの機能調節の調節などが挙げられるがそれらに限定されない。これらは例えば、免疫学的アッセイ、リン酸化定量などによって測定することができる。

#### 【0564】

好ましい実施形態において、上記（a）～（c）のいずれか1つのポリヌクレオチドまたはその相補配列に対する同一性は、少なくとも約80%であり得、より好ましくは少なくとも約90%であり得、さらに好ましくは少なくとも約98%であり得、もっとも好ましくは少なくとも約99%であり得る。

#### 【0565】

好ましい実施形態において、本発明のP e p 5をコードする核酸分子またはそのフラグメントおよび改変体は、少なくとも8の連続するヌクレオチド長であり得る。本発明の核酸分子は、本発明の使用目的によってその適切なヌクレオチド長が変動し得る。より好ましくは、本発明の核酸分子は、少なくとも10の連続するヌクレオチド長であり得、さらに好ましくは少なくとも15の連続するヌクレオチド長であり得、なお好ましくは少なくとも20の連続するヌクレオチド長であり得る。これらのヌクレオチド長の下限は、具体的に挙げた数字のほかに、それらの間の数（例えば、9、11、12、13、14、16など）あるいは、それ以上の数（例えば、21、22、... 30、など）であってもよい。本発明の核酸分子は、目的とする用途（例えば、アンチセンス、RNA i、マーカー、プライマー、プローブ、所定の因子と相互作用し得ること）として使用することができる限り、その上限の長さは、配列番号1に示す配列の全長であってもよく、それを超える長さであってもよい。あるいは、プライマーとして使用する場合は、通常少なくとも約8のヌクレオチド長であり得、好ましくは約10ヌクレオチド長であり得る。プローブとし

て使用する場合は、通常少なくとも約15ヌクレオチド長であり得、好ましくは約17ヌクレオチド長であり得る。

**【0566】**

1つの実施形態において、Pep5をコードする核酸分子、またはそのフラグメントもしくは改変体は、配列番号1の核酸配列の全範囲を含む。より好ましくは、Pep5をコードする核酸分子、またはそのフラグメントもしくは改変体は、配列番号1の核酸配列の全範囲からなる。

**【0567】**

1つの実施形態において、処置されるべき神経の疾患、障害または状態は、本明細書において他の場所において記載されており、例えば、アルツハイマー病、脊髄損傷、脳血管障害、脳外傷などを含む。好ましくは、本発明の組成物が対象とする神経の疾患、障害または状態は、アルツハイマー病であり得る。他に好ましい実施形態では、本発明の組成物が対象とする神経の疾患、障害または状態は、脊髄損傷、脳血管障害、脳外傷であり得る。

**【0568】**

(P75のポリペプチド形態に対して特異的に相互作用する因子)

1つの局面において、本発明は、p75ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子を含む神経を再生するための組成物、およびp75ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子を含む神経疾患、神経障害または神経の状態の、処置、予防、診断または予後のための組成物を提供する。ここで、再生、診断、予防、処置または予後上有効な量は、本明細書の開示に基づいて、当該分野において周知の技法を用いて当業者が種々のパラメータを参酌しながら決定することができ、そのような量を決定するためには、例えば、使用目的、対象疾患（種類、重篤度など）、患者の年齢、体重、性別、既往歴、細胞の形態または種類などを考慮して、当業者が容易に決定することができる（神経内科治療ガイド、小川紀雄著、中外医学社 1994を参照）。本発明では、神経の再生が、p75シグナル伝達経路を遮断することによって（p75に特異的に相互作用する因子による）、神経突起伸展の障害が破壊されることによることが明らかになった。このようなシグナル伝達経路の遮断による神経再生の効果は従来知られておらず、したがって、本発明は、従来技術より優れた効果を示す。

**【0569】**

1つの実施形態において、本発明の因子は、(a) 配列番号4に記載のアミノ酸配列またはそのフラグメントからなる、ポリペプチド；(b) 配列番号4に記載のアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも1つの変異を有し、かつ、生物学的活性を有する、ポリペプチド；(c) 配列番号3または16に記載の塩基配列のスプライス変異体または対立遺伝子変異体によってコードされる、ポリペプチド；(d) 配列番号4に記載のアミノ酸配列の種相同体である、ポリペプチド；または(e) (a)～(d)のいずれか1つのポリペプチドに対する相同性が少なくとも70%であるアミノ酸配列を有し、かつ、生物学的活性を有する、ポリペプチド、と特異的に相互作用する、因子であり得る。

**【0570】**

1つの好ましい実施形態において、上記(b)における置換、付加および欠失の数は限定されていてもよく、例えば、50以下、40以下、30以下、20以下、15以下、10以下、9以下、8以下、7以下、6以下、5以下、4以下、3以下、2以下であることが好ましい。より少ない数の置換、付加および欠失が好ましいが、生物学的活性を保持する（好ましくは、P75遺伝子産物と類似するかまたは実質的に同一の活性を有する）限り、多い数であってもよい。

**【0571】**

好ましい実施形態において、本発明の因子は、核酸分子、ポリペプチド、脂質、糖鎖、有機低分子およびそれらの複合分子からなる群より選択される。

**【0572】**

別の好ましい実施形態において、上記(c)における対立遺伝子変異体は、配列番号4に示すアミノ酸配列と少なくとも99%の相同性を有することが好ましい。

【0573】

別の好ましい実施形態において、上記種相同体は、本明細書中上述のように同定することができ、配列番号4に示すアミノ酸配列と少なくとも約30%の相同性を有することが好ましい。好ましくは、種相同体は、上記基準配列と、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約98%、相同であり得る。

別の好ましい実施形態において、上記(e)における上記改変体ポリペプチドが有する生物学的活性としては、例えば、配列番号4に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドまたはそのフラグメントに対して特異的な抗体との相互作用、RhogDIとの相互作用などが挙げられるがそれらに限定されない。

【0574】

好ましい実施形態において、上記(a)～(d)のいずれか1つのポリペプチドに対する相同性は、少なくとも約80%であり得、より好ましくは少なくとも約90%であり得、さらに好ましくは少なくとも約98%であり得、もっとも好ましくは少なくとも約99%であり得る。

【0575】

本発明の因子が特異的に相互作用するポリペプチドは、通常、少なくとも3の連続するアミノ酸配列を有する。本発明のポリペプチドが有するアミノ酸長は、目的とする用途に適合する限り、どれだけ短くてもよいが、好ましくは、より長い配列が使用され得る。従って、好ましくは、少なくとも4アミノ酸長、より好ましくは少なくとも5アミノ酸長、少なくとも6アミノ酸長、少なくとも7アミノ酸長、少なくとも8アミノ酸長、少なくとも9アミノ酸長、少なくとも10アミノ酸長であってもよい。さらに好ましくは少なくとも15アミノ酸長であり得、なお好ましくは少なくとも20アミノ酸長であり得る。これらのアミノ酸長の下限は、具体的に挙げた数字のほかに、それらの間の数(例えば、11、12、13、14、16など)あるいは、それ以上の数(例えば、21、22、...、30、など)であってもよい。本発明の因子が特異的に相互作用するポリペプチドは、ある因子と相互作用することができる限り、その上限の長さは、配列番号4に示す配列の全長と同一であってもよく、それを超える長さであってもよい。

【0576】

好ましい実施形態において、本発明の因子は、核酸分子、ポリペプチド、脂質、糖鎖、有機低分子およびそれらの複合分子からなる群より選択される。より好ましくは、本発明の因子は、抗体またはその誘導体(例えば、単鎖抗体)である。従って、本発明の因子は、プローブおよび/またはインヒビターとして使用することができる。

【0577】

1つの実施形態において、P75ポリペプチド、またはそのフラグメントもしくは改変体は、配列番号4のアミノ酸273～427位または配列番号17のアミノ酸275位～425位の範囲を含む。他に好ましい実施形態では、p75ポリペプチド、またはそのフラグメントもしくは改変体は、配列番号4のアミノ酸393位～408位、または配列番号17のアミノ酸391位～406位の範囲を含む。

【0578】

1つの実施形態において、処置されるべき神経の疾患、障害または状態は、本明細書において他の場所において記載されており、例えば、アルツハイマー病、脊髄損傷、脳血管障害、脳外傷などを含む。好ましくは、本発明の組成物が対象とする神経の疾患、障害または状態は、アルツハイマー病であり得る。他に好ましい実施形態では、本発明の組成物が対象とする神経の疾患、障害または状態は、脊髄損傷、脳血管障害、脳外傷であり得る。

【0579】

好ましい実施形態において、本発明の因子は、標識されているかまたは標識と結合し得

るものであることが有利であり得る。そのように標識がされている場合、本発明の因子によって測定することができる種々の状態を直接および／または容易に測定することができる。そのような標識は、識別可能に標識される限り、どのような標識でもよく、例えば、蛍光標識、化学発光標識、放射能標識などが挙げられるがそれらに限定されない。あるいは、その因子が抗体などの免疫反応を利用して相互作用する場合、ビオチン-スト렙トアビジンのような免疫反応においてよく利用される系を用いてもよい。

#### 【0580】

(p75ポリペプチドの核酸形態に対して相互作用する因子)

1つの局面において、本発明は、P75ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子を含む神経を再生するための組成物、およびP75ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子を含む神経疾患、神経障害または神経の状態の、処置、予防、診断または予後のための組成物を提供する。ここで、再生、診断、予防、処置または予後上有効な量は、当該分野において周知の技法を用いて当業者が種々のパラメータを参酌しながら決定することができ、そのような量を決定するためには、例えば、使用目的、対象疾患（種類、重篤度など）、患者の年齢、体重、性別、既往歴、細胞の形態または種類などを考慮して、当業者が容易に決定することができる（神経内科治療ガイド、小川紀雄著、中外医学社 1994を参照）。本発明では、神経の再生が、p75シグナル伝達経路を遮断することによって（p75に特異的に相互作用する因子による）、神経突起伸展の障害が破壊されることによることが明らかになった。このようなシグナル伝達経路の遮断による神経再生の効果は従来知られておらず、したがって、本発明は、従来技術より優れた効果を示す。

#### 【0581】

1つの実施形態において、この因子は、(a) 配列番号3または16に記載の塩基配列またはそのフラグメント配列を有するポリヌクレオチド；(b) 配列番号4に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドまたはそのフラグメントをコードするポリヌクレオチド；(c) 配列番号4に記載のアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が、置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも1つの変異を有する改変体ポリペプチドであって、生物学的活性を有する改変体ポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチド；(d) 配列番号3または16に記載の塩基配列のスプライス変異体または対立遺伝子変異体である、ポリヌクレオチド；(e) 配列番号4に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドの種相同体をコードする、ポリヌクレオチド；(f) (a)～(e)のいずれか1つのポリヌクレオチドにストリンジェント条件下でハイブリダイズし、かつ生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；または(g) (a)～(e)のいずれか1つのポリヌクレオチドまたはその相補配列に対する同一性が少なくとも70%である塩基配列からなり、かつ、生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、と特異的に相互作用する、因子であり得る。

#### 【0582】

1つの好ましい実施形態において、上記(c)における置換、付加および欠失の数は、限定され、例えば、50以下、40以下、30以下、20以下、15以下、10以下、9以下、8以下、7以下、6以下、5以下、4以下、3以下、2以下であることが好ましい。より少ない数の置換、付加および欠失が好ましいが、生物学的活性を保持する（好ましくは、P75遺伝子産物と類似するかまたは実質的に同一の活性を有する）限り、多い数であってもよい。

#### 【0583】

別の好ましい実施形態において、上記改変体ポリペプチドが有する生物学的活性としては、例えば、配列番号4に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドまたはそのフラグメントに対して特異的な抗体との相互作用、p75との相互作用、p75によるRhogDの機能調節の調節などが挙げられるがそれらに限定されない。これらは例えば、免疫学的アッセイ、リン酸化定量などによって測定することができる。

#### 【0584】

別の好ましい実施形態において、対立遺伝子変異体は、配列番号 3 または 16 に示す核酸配列と少なくとも 99% の相同性を有することが有利である。

**【0585】**

上記種相同体は、その種の遺伝子配列データベースが存在する場合、そのデータベースに対して、本発明の P 75 をクエリ配列として検索することによって同定することができる。あるいは、本発明の P 75 の全部または一部をプローブまたはプライマーとして、その種の遺伝子ライブラリーをスクリーニングすることによって同定することができる。そのような同定方法は、当該分野において周知であり、本明細書において記載される文献にも記載されている。種相同体は、例えば、配列番号 3 または 16 に示す核酸配列と少なくとも約 30% の相同性を有することが好ましい。好ましくは、種相同体は、上記基準配列と、少なくとも約 40%、少なくとも約 50%、少なくとも約 60%、少なくとも約 70%、少なくとも約 80%、少なくとも約 90%、少なくとも約 95%、少なくとも約 98%、相同であり得る。

**【0586】**

好ましい実施形態において、上記 (a) ~ (e) のいずれか 1 つのポリヌクレオチドまたはその相補配列に対する同一性は、少なくとも約 80% であり得、より好ましくは少なくとも約 90% であり得、さらに好ましくは少なくとも約 98% であり得、もっとも好ましくは少なくとも約 99% であり得る。

**【0587】**

好ましい実施形態において、本発明の P 75 をコードする核酸分子またはそのフラグメントおよび改変体は、少なくとも 8 の連続するヌクレオチド長であり得る。本発明の核酸分子は、本発明の使用目的によってその適切なヌクレオチド長が変動し得る。より好ましくは、本発明の核酸分子は、少なくとも 10 の連続するヌクレオチド長であり得、さらに好ましくは少なくとも 15 の連続するヌクレオチド長であり得、なお好ましくは少なくとも 20 の連続するヌクレオチド長であり得る。これらのヌクレオチド長の下限は、具体的に挙げた数字のほかに、それらの間の数（例えば、9、11、12、13、14、16 など）あるいは、それ以上の数（例えば、21、22、... 30、など）であってもよい。本発明の核酸分子は、目的とする用途（例えば、アンチセンス、RNAi、マーカー、プライマー、プローブ、所定の因子と相互作用し得ること）として使用することができる限り、その上限の長さは、配列番号 3 または 16 に示す配列の全長であってもよく、それを超える長さであってもよい。あるいは、プライマーとして使用する場合は、通常少なくとも約 8 のヌクレオチド長であり得、好ましくは約 10 ヌクレオチド長であり得る。プローブとして使用する場合は、通常少なくとも約 15 ヌクレオチド長であり得、好ましくは約 17 ヌクレオチド長であり得る。

**【0588】**

1 つの実施形態において、P 75 をコードする核酸分子、またはそのフラグメントもしくは改変体は、配列番号 3 の核酸配列の 114 位 ~ 1397 位または配列番号 16 の核酸配列の 114 ~ 1391 位の範囲を含む。より好ましくは、P 75 をコードする核酸分子、またはそのフラグメントもしくは改変体は、配列番号 3 の核酸配列 1 位 ~ 3386 位、または配列番号 16 の核酸配列 1 位 ~ 3259 位の範囲を含む。

**【0589】**

1 つの実施形態において、処置されるべき神経の疾患、障害または状態は、本明細書において他の場所において記載されており、例えば、アルツハイマー病、脊髄損傷、脳血管障害、脳外傷などを含む。好ましくは、本発明の組成物が対象とする神経の疾患、障害または状態は、アルツハイマー病であり得る。他に好ましい実施形態では、本発明の組成物が対象とする神経の疾患、障害または状態は、脊髄損傷、脳血管障害、脳外傷であり得る。

**【0590】**

好ましい実施形態において、本発明の因子は、核酸分子、ポリペプチド、脂質、糖鎖、有機低分子およびそれらの複合分子からなる群より選択される。

## 【0591】

好ましい実施形態では、本発明の因子は、核酸分子である。本発明の因子が核酸分子である場合、そのような核酸分子は、少なくとも8の連続するヌクレオチド長であり得る。本発明の核酸分子は、本発明の使用目的によってその適切なヌクレオチド長が変動し得る。より好ましくは、本発明の核酸分子は、少なくとも10の連続するヌクレオチド長であり得、さらに好ましくは少なくとも15の連続するヌクレオチド長であり得、なお好ましくは少なくとも20の連続するヌクレオチド長であり得る。これらのヌクレオチド長の下限は、具体的に挙げた数字のほかに、それらの間の数（例えば、9、11、12、13、14、16など）あるいは、それ以上の数（例えば、21、22、... 30、など）であってもよい。本発明の核酸分子は、目的とする用途（例えば、マーカー、プライマー、プローブ）として使用することができる限り、その上限の長さは、配列番号1に示す配列の全長であってもよく、それを超える長さであってもよい。あるいは、プライマーとして使用する場合は、通常少なくとも約8のヌクレオチド長であり得、好ましくは約10ヌクレオチド長であり得る。プローブとして使用する場合は、通常少なくとも約15ヌクレオチド長であり得、好ましくは約17ヌクレオチド長であり得る。

## 【0592】

従って、1つの例示的な実施形態において、本発明の因子は、上記(a)～(g)のいずれかのポリヌクレオチドの核酸配列に対して相補的な配列またはそれに対して少なくとも70%の同一性を有する配列を有する核酸分子であり得る。

## 【0593】

別の例示的な実施形態において、本発明の因子は、(a)～(g)のいずれかのポリヌクレオチドの核酸配列に対してストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸分子であり得る。

## 【0594】

別の好ましい実施形態では、本発明の因子は、アンチセンスまたはRNAiである。RNAiは、siRNAであってもshRNAであってもよく、そのような例としては、たとえば、約20塩基前後（例えば、代表的には約21～23塩基長）またはそれ未満の長さの二本鎖RNAであって、好ましくは、5'-リン酸、3'-OHの構造を有しており、3'末端は約2塩基突出している。shRNAはまた、好ましくは、3'突出末端を有し得る。二本鎖部分の長さは特に限定されないが、好ましくは約10ヌクレオチド長以上、より好ましくは約20ヌクレオチド長以上であり得る。ここで、3'突出末端は、好ましくはDNAであり得、より好ましくは少なくとも2ヌクレオチド長以上のDNAであり得、さらに好ましくは2～4ヌクレオチド長のDNAであり得る。

## 【0595】

(p75細胞外ドメインのポリペプチド形態)

1つの局面において、本発明は、p75細胞外ドメインポリペプチドを含む神経を再生するための組成物、およびp75細胞外ドメインポリペプチドを含む神経疾患、神経障害または神経の状態の、処置、予防、診断または予後のための組成物を提供する。ここで、再生、診断、予防、処置または予後上有効な量は、当該分野において周知の技法を用いて当業者が種々のパラメータを参酌しながら決定することができ、そのような量を決定するためには、例えば、使用目的、対象疾患（種類、重篤度など）、患者の年齢、体重、性別、既往歴、細胞の形態または種類などを考慮して、当業者が容易に決定することができる（神経内科治療ガイド、小川紀雄著、中外医学社 1994を参照）。本発明では、神経の再生が、p75シグナル伝達経路を遮断することによって（p75細胞外ドメインポリペプチドによる）、神経突起伸展の障害が破壊されることによることが明らかになった。このようなシグナル伝達経路の遮断による神経再生の効果は従来知られておらず、したがって、本発明は、従来技術より優れた効果を示す。

## 【0596】

1つの実施形態において、本発明のp75細胞外ドメインは、(a)配列番号3または16に記載の核酸配列の、それぞれヌクレオチド198位～863位または201位～8

66位もしくはそのフラグメントによってコードされる、ポリペプチド；(b) 配列番号4に記載のアミノ酸配列、それぞれアミノ酸29位～250位または30位～251位もしくはそのフラグメントを有する、ポリペプチド；(c) 配列番号4に記載のアミノ酸配列、それぞれアミノ酸29位～250位または30位～251位において、1以上のアミノ酸が、置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも1つの変異を有する改変体ポリペプチドであって、生物学的活性を有する、改変体ポリペプチド(d) 配列番号3または16に記載の塩基配列、それぞれヌクレオチド198位～863位または201位～866位のスプライス改変体もしくは対立遺伝子改変体によってコードされる、ポリペプチド；(e) 配列番号4に記載のアミノ酸配列の、それぞれアミノ酸29位～250位または30位～251位を有するポリペプチドの、種相同体ポリペプチド；または(f) (a)～(e)のいずれか1つのポリペプチドのアミノ酸配列に対する同一性が少なくとも70%であるアミノ酸配列からなり、かつ、生物学的活性を有する、ポリペプチド、を含む。

#### 【0597】

1つの好ましい実施形態において、上記(b)における置換、付加および欠失の数は限定されていてもよく、例えば、50以下、40以下、30以下、20以下、15以下、10以下、9以下、8以下、7以下、6以下、5以下、4以下、3以下、2以下であることが好ましい。より少ない数の置換、付加および欠失が好ましいが、生物学的活性を保持する(好ましくは、p75遺伝子産物と類似するかまたは実質的に同一の活性を有する)限り、多い数であってもよい。

#### 【0598】

別の好ましい実施形態において、上記(c)における対立遺伝子変異体は、配列番号4に示すアミノ酸配列と少なくとも99%の相同性を有することが好ましい。

#### 【0599】

別の好ましい実施形態において、上記種相同体は、本明細書中上述のように同定することができ、配列番号4に示すアミノ酸配列と少なくとも約30%の相同性を有することが好ましい。好ましくは、種相同体は、上記基準配列と、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約98%、相同であり得る。

#### 【0600】

上記種相同体は、その種の遺伝子配列データベースが存在する場合、そのデータベースに対して、本発明のp75をクエリ配列として検索することによって同定することができる。あるいは、本発明のp75の全部または一部をプローブまたはプライマーとして、その種の遺伝子ライブラリーをスクリーニングすることによって同定することができる。そのような同定方法は、当該分野において周知であり、本明細書において記載される文献にも記載されている。種相同体は、例えば、配列番号3または16に示す核酸配列または配列番号4に示すアミノ酸配列と少なくとも約30%の相同性を有することが好ましい。好ましくは、種相同体は、上記基準配列と、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約98%、相同であり得る。

#### 【0601】

別の好ましい実施形態において、上記(e)における上記改変体ポリペプチドが有する生物学的活性としては、例えば、配列番号4に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドまたはそのフラグメントに対して特異的な抗体との相互作用、Pep5との相互作用、Rhoとの相互作用、G1bとの相互作用、MAGとの相互作用、NgRとの相互作用、Nogoとの相互作用、OMgpとの相互作用、p75によるRho GDIの機能調節の調節などが挙げられるがそれらに限定されない。これらは例えば、免疫学的アッセイ、リン酸化定量などによって測定することができる。

#### 【0602】

好ましい実施形態において、上記(a)～(d)のいずれか1つのポリペプチドに対す



る相同性は、少なくとも約80%であり得、より好ましくは少なくとも約90%であり得、さらに好ましくは少なくとも約98%であり得、もっとも好ましくは少なくとも約99%であり得る。

#### 【0603】

本発明のポリペプチドは、通常、少なくとも3の連続するアミノ酸配列を有する。本発明のポリペプチドが有するアミノ酸長は、目的とする用途に適合する限り、どれだけ短くてもよいが、好ましくは、より長い配列が使用され得る。従って、好ましくは、少なくとも4アミノ酸長、より好ましくは少なくとも5アミノ酸長、少なくとも6アミノ酸長、少なくとも7アミノ酸長、少なくとも8アミノ酸長、少なくとも9アミノ酸長、少なくとも10アミノ酸長であってもよい。さらに好ましくは少なくとも15アミノ酸長であり得、なお好ましくは少なくとも20アミノ酸長であり得る。これらのアミノ酸長の下限は、具体的に挙げた数字のほかに、それらの間の数（例えば、11、12、13、14、16など）あるいは、それ以上の数（例えば、21、22、... 30、など）であってもよい。本発明のポリペプチドは、ある因子と相互作用することができる限り、その上限の長さは、配列番号4に示す配列の全長と同一であってもよく、それを超える長さであってもよい。

#### 【0604】

1つの実施形態において、p75細胞外ドメインポリペプチド、またはそのフラグメントもしくは改変体は、配列番号4または17の、それぞれアミノ酸29位～250位または30位～251位の範囲を含む。より好ましくは、p75細胞外ドメインポリペプチド、またはそのフラグメントもしくは改変体は、配列番号4または17の、それぞれアミノ酸29位～250位または30位～251位からなる。

#### 【0605】

1つの実施形態において、処置されるべき神経の疾患、障害または状態は、本明細書において他の場所において記載されており、例えば、アルツハイマー病、脊髄損傷、脳血管障害、脳外傷などを含む。好ましくは、本発明の組成物が対象とする神経の疾患、障害または状態は、アルツハイマー病であり得る。他に好ましい実施形態では、本発明の組成物が対象とする神経の疾患、障害または状態は、脊髄損傷、脳血管障害、脳外傷であり得る。

#### 【0606】

別の実施形態において、本発明のp75細胞外ドメインポリペプチドは、可溶性であることが好ましい。そのような可溶性のポリペプチドは、膜貫通ドメインを全部または一部削減することによって遺伝子工学的または合成により作製することができる。

#### 【0607】

(p75細胞外ドメインポリペプチドの核酸形態)

1つの局面において、本発明は、p75細胞外ドメインポリペプチドをコードする核酸分子を含む神経を再生するための組成物、およびp75細胞外ドメインポリペプチドをコードする核酸分子を含む神経疾患、神経障害または神経の状態の、処置、予防、診断または予後のための組成物を提供する。ここで、再生、診断、予防、処置または予後上有効な量は、当該分野において周知の技法を用いて当業者が種々のパラメータを参酌しながら決定することができ、そのような量を決定するためには、例えば、使用目的、対象疾患（種類、重篤度など）、患者の年齢、体重、性別、既往歴、細胞の形態または種類などを考慮して、当業者が容易に決定することができる（神経内科治療ガイド、小川紀雄著、中外医学社 1994を参照）。本発明では、神経の再生が、p75シグナル伝達経路を遮断することによって（p75細胞外ドメインポリペプチドによる）、神経突起伸展の障害が破壊されることによることが明らかになった。このようなシグナル伝達経路の遮断による神経再生の効果は従来知られておらず、したがって、本発明は、従来技術より優れた効果を示す。

#### 【0608】

1つの実施形態において、本発明において用いられるp75細胞外ドメインポリペプチ

ドをコードする核酸分子、またはそのフラグメントもしくは改変体は、(a) 配列番号 3 または 16 に記載の塩基配列、それぞれヌクレオチド 198 位～863 位または 201 位～866 位またはそのフラグメント配列を有する、ポリヌクレオチド；(b) 配列番号 4 または 17 に記載のアミノ酸配列、それぞれアミノ酸 29 位～250 位または 30 位～251 位またはそのフラグメントをコードする、ポリヌクレオチド、(c) 配列番号 4 または 17 に記載のアミノ酸配列の、それぞれアミノ酸 29 位～250 位または 30 位～251 位において、1 以上のアミノ酸が、置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも 1 つの変異を有する改変体ポリペプチドであって、生物学的活性を有する改変体ポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチド；(d) 配列番号 3 または 16 に記載の塩基配列の、それぞれヌクレオチド 198 位～863 位または 201 位～866 位のスプライス変異体または対立遺伝子変異体である、ポリヌクレオチド；(e) 配列番号 4 に記載のアミノ酸配列、それぞれアミノ酸 29 位～250 位または 30 位～251 位からなるポリペプチドの種相同体をコードする、ポリヌクレオチド；(f) (a)～(e) のいずれか 1 つのポリヌクレオチドにストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；または (g) (a)～(e) のいずれか 1 つのポリヌクレオチドまたはその相補配列に対する同一性が少なくとも 70 % である塩基配列からなり、かつ、生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、からなる群より選択される、ポリヌクレオチド、を含む。

#### 【0609】

1 つの好ましい実施形態において、上記 (c) における置換、付加および欠失の数は、限定され、例えば、50 以下、40 以下、30 以下、20 以下、15 以下、10 以下、9 以下、8 以下、7 以下、6 以下、5 以下、4 以下、3 以下、2 以下であることが好ましい。より少ない数の置換、付加および欠失が好ましいが、生物学的活性を保持する（好ましくは、p75 細胞外ドメイン遺伝子産物と類似するかまたは実質的に同一の活性を有する）限り、多い数であってもよい。

#### 【0610】

別の好ましい実施形態において、上記改変体ポリペプチドが有する生物学的活性としては、例えば、配列番号 4 または 17 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドまたはそのフラグメントに対して特異的な抗体との相互作用、配列番号 4 または 17 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドまたはそのフラグメントに対して特異的な抗体との相互作用、Pep5 との相互作用、Rho との相互作用、G1b との相互作用、MAG との相互作用、NgR との相互作用、Nogo との相互作用、OMgp との相互作用、p75 による Rho GDI の機能調節の調節などが挙げられるがそれらに限定されない。これらは例えば、免疫学的アッセイ、リン酸化定量などによって測定することができる。

#### 【0611】

別の好ましい実施形態において、(c) に記載される対立遺伝子変異体は、配列番号 3 または 16 に示す核酸配列と少なくとも 99 % の相同性を有することが有利である。

#### 【0612】

上記種相同体は、その種の遺伝子配列データベースが存在する場合、そのデータベースに対して、本発明の p75 細胞外ドメインをクエリ配列として検索することによって同定することができる。あるいは、本発明の p75 細胞外ドメインの全部または一部をプローブまたはプライマーとして、その種の遺伝子ライブラリーをスクリーニングすることによって同定することができる。そのような同定方法は、当該分野において周知であり、本明細書において記載される文献にも記載されている。種相同体は、例えば、配列番号 3 または 16 に示す核酸配列と少なくとも約 30 % の相同性を有することが好ましい。好ましくは、種相同体は、上記基準配列と、少なくとも約 40 %、少なくとも約 50 %、少なくとも約 60 %、少なくとも約 70 %、少なくとも約 80 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 98 %、相同であり得る。

#### 【0613】

好ましい実施形態において、上記 (a)～(e) のいずれか 1 つのポリヌクレオチドま

たはその相補配列に対する同一性は、少なくとも約80%であり得、より好ましくは少なくとも約90%であり得、さらに好ましくは少なくとも約98%であり得、もっとも好ましくは少なくとも約99%であり得る。

#### 【0614】

好ましい実施形態において、本発明のp75細胞外ドメインポリペプチドをコードする核酸分子またはそのフラグメントおよび改変体は、少なくとも8の連続するヌクレオチド長であり得る。本発明の核酸分子は、本発明の使用目的によってその適切なヌクレオチド長が変動し得る。より好ましくは、本発明の核酸分子は、少なくとも10の連続するヌクレオチド長であり得、さらに好ましくは少なくとも15の連続するヌクレオチド長であり得、なお好ましくは少なくとも20の連続するヌクレオチド長であり得る。これらのヌクレオチド長の下限は、具体的に挙げた数字のほかに、それらの間の数（例えば、9、11、12、13、14、16など）あるいは、それ以上の数（例えば、21、22、...、30、など）であってもよい。本発明の核酸分子は、目的とする用途（例えば、アンチセンス、RNAi、マーカー、プライマー、プローブ、所定の因子と相互作用し得ること）として使用することができる限り、その上限の長さは、配列番号3または16に示す配列の全長であってもよく、それを超える長さであってもよい。あるいは、プライマーとして使用する場合は、通常少なくとも約8のヌクレオチド長であり得、好ましくは約10ヌクレオチド長であり得る。プローブとして使用する場合は、通常少なくとも約15ヌクレオチド長であり得、好ましくは約17ヌクレオチド長であり得る。

#### 【0615】

1つの実施形態において、p75細胞外ドメインポリペプチドをコードする核酸分子、またはそのフラグメントもしくは改変体は、配列番号3または16の核酸配列のうち、それぞれヌクレオチド198位～863位または201位～866位の範囲を含む。より好ましくは、p75細胞外ドメインをコードする核酸分子、またはそのフラグメントもしくは改変体は、配列番号3または16の核酸配列の、それぞれヌクレオチド198位～863位または201位～866位からなる。

#### 【0616】

1つの実施形態において、処置されるべき神経の疾患、障害または状態は、本明細書において他の場所において記載されており、例えば、アルツハイマー病、脊髄損傷、脳血管障害、脳外傷などを含む。好ましくは、本発明の組成物が対象とする神経の疾患、障害または状態は、アルツハイマー病であり得る。他に好ましい実施形態では、本発明の組成物が対象とする神経の疾患、障害または状態は、脊髄損傷、脳血管障害、脳外傷であり得る。

#### 【0617】

別の実施形態において、本発明のp75細胞外ドメインポリペプチドは、可溶性であることが好ましい。そのような可溶性のポリペプチドをコードする核酸分子は、膜貫通ドメインをコードする核酸配列を全部または一部削減することによって遺伝子工学的または合成により作製することができる。

#### 【0618】

(Rhoのポリペプチド形態)

1つの局面において、本発明は、Rhoポリペプチドを含む神経を再生するための組成物、およびRhoポリペプチドを含む神経疾患、神経障害または神経の状態の、処置、予防、診断または予後のための組成物を提供する。ここで、再生、診断、予防、処置または予後上有効な量は、当該分野において周知の技法を用いて当業者が種々のパラメータを参酌しながら決定することができ、そのような量を決定するためには、例えば、使用目的、対象疾患（種類、重篤度など）、患者の年齢、体重、性別、既往歴、細胞の形態または種類などを考慮して、当業者が容易に決定することができる（神経内科治療ガイド、小川紀雄著、中外医学社 1994を参照）。本発明では、神経の再生が、p75シグナル伝達経路を遮断することによって（Rhoポリペプチドの調節による）、神経突起伸展の障害が破壊されることによることが明らかになった。このようなシグナル伝達経路の遮断によ

る神経再生の効果は従来知られておらず、したがって、本発明は、従来技術より優れた効果を示す。

#### 【0619】

1つの実施形態において、本発明のRhoポリペプチドは、(a) 配列番号5に記載の核酸配列またはそのフラグメントによってコードされる、ポリペプチド；(b) 配列番号6に記載のアミノ酸配列またはそのフラグメントを有する、ポリペプチド；(c) 配列番号6に記載のアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が、置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも1つの変異を有する改変体ポリペプチドであって、生物学的活性を有する、改変体ポリペプチド(d) 配列番号5に記載の塩基配列のスプライス改変体もしくは対立遺伝子改変体によってコードされる、ポリペプチド；(e) 配列番号6に記載のアミノ酸配列の種相同体ポリペプチド；または(f) (a)～(e)のいずれか1つのポリペプチドのアミノ酸配列に対する同一性が少なくとも70%であるアミノ酸配列からなり、かつ、生物学的活性を有する、ポリペプチド、を含む。

#### 【0620】

1つの好ましい実施形態において、上記(b)における置換、付加および欠失の数は限定されていてもよく、例えば、50以下、40以下、30以下、20以下、15以下、10以下、9以下、8以下、7以下、6以下、5以下、4以下、3以下、2以下であることが好ましい。より少ない数の置換、付加および欠失が好ましいが、生物学的活性を保持する(好ましくは、RhoまたはRhoA遺伝子産物と類似するかまたは実質的に同一の活性を有する)限り、多い数であってもよい。

#### 【0621】

別の好ましい実施形態において、上記(c)における対立遺伝子変異体は、配列番号6に示すアミノ酸配列と少なくとも99%の同一性を有することが好ましい。

#### 【0622】

別の好ましい実施形態において、上記種相同体は、本明細書中上述のように同定することができ、配列番号6に示すアミノ酸配列と少なくとも約30%の同一性を有することが好ましい。好ましくは、種相同体は、上記基準配列と、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約98%、相同であり得る。

#### 【0623】

上記種相同体は、その種の遺伝子配列データベースが存在する場合、そのデータベースに対して、本発明のRho(またはより好ましくはRhoA)をクエリ配列として検索することによって同定することができる。あるいは、本発明のRho(またはより好ましくはRhoA)の全部または一部をプローブまたはプライマーとして、その種の遺伝子ライブラリーをスクリーニングすることによって同定することができる。そのような同定方法は、当該分野において周知であり、本明細書において記載される文献にも記載されている。種相同体は、例えば、配列番号5に示す核酸配列または配列番号6に示すアミノ酸配列と少なくとも約30%の同一性を有することが好ましい。好ましくは、種相同体は、上記基準配列と、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約98%、相同であり得る。

#### 【0624】

別の好ましい実施形態において、上記(e)における上記改変体ポリペプチドが有する生物学的活性としては、例えば、配列番号6に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドまたはそのフラグメントに対して特異的な抗体との相互作用、Pep5との相互作用、p75との相互作用、GTLbとの相互作用、MAGとの相互作用、Rho GDIとの相互作用などが挙げられるがそれらに限定されない。これらは例えば、免疫学的アッセイ、リン酸化定量などによって測定することができる。

#### 【0625】

好ましい実施形態において、上記(a)～(d)のいずれか1つのポリペプチドに対す

る相同性は、少なくとも約80%であり得、より好ましくは少なくとも約90%であり得、さらに好ましくは少なくとも約98%であり得、もっとも好ましくは少なくとも約99%であり得る。最も好ましくは、本発明のR h oポリペプチドは、R h o Aポリペプチドである。

#### 【0626】

本発明のポリペプチドは、通常、少なくとも3の連続するアミノ酸配列を有する。本発明のポリペプチドが有するアミノ酸長は、目的とする用途に適合する限り、どれだけ短くてもよいが、好ましくは、より長い配列が使用され得る。従って、好ましくは、少なくとも4アミノ酸長、より好ましくは少なくとも5アミノ酸長、少なくとも6アミノ酸長、少なくとも7アミノ酸長、少なくとも8アミノ酸長、少なくとも9アミノ酸長、少なくとも10アミノ酸長であってもよい。さらに好ましくは少なくとも15アミノ酸長であり得、なお好ましくは少なくとも20アミノ酸長であり得る。これらのアミノ酸長の下限は、具体的に挙げた数字のほかに、それらの間の数（例えば、11、12、13、14、16など）あるいは、それ以上の数（例えば、21、22、... 30、など）であってもよい。本発明のポリペプチドは、ある因子と相互作用することができる限り、その上限の長さは、配列番号6に示す配列の全長と同一であってもよく、それを超える長さであってもよい。

#### 【0627】

1つの実施形態において、R h oポリペプチド、またはそのフラグメントもしくは改変体は、配列番号6の、それぞれアミノ酸29位～250位または30位～251位の範囲を含む。より好ましくは、R h oポリペプチド、またはそのフラグメントもしくは改変体は、配列番号6の、それぞれアミノ酸29位～250位または30位～251位からなる。

#### 【0628】

1つの実施形態において、処置されるべき神経の疾患、障害または状態は、本明細書において他の場所において記載されており、例えば、アルツハイマー病、脊髄損傷、脳血管障害、脳外傷などを含む。好ましくは、本発明の組成物が対象とする神経の疾患、障害または状態は、アルツハイマー病であり得る。他に好ましい実施形態では、本発明の組成物が対象とする神経の疾患、障害または状態は、脊髄損傷、脳血管障害、脳外傷であり得る。

#### 【0629】

別の実施形態において、本発明のR h oポリペプチドは、可溶性であることが好ましい。そのような可溶性のポリペプチドは、膜貫通ドメインを全部または一部削減することによって遺伝子工学的または合成により作製することができる。

#### 【0630】

(R h oポリペプチドの核酸形態)

1つの局面において、本発明は、R h oポリペプチドをコードする核酸分子を含む神経を再生するための組成物、およびR h oポリペプチドをコードする核酸分子を含む神経疾患、神経障害または神経の状態の、処置、予防、診断または予後のための組成物を提供する。ここで、再生、診断、予防、処置または予後上有効な量は、当該分野において周知の技法を用いて当業者が種々のパラメータを参酌しながら決定することができ、そのような量を決定するためには、例えば、使用目的、対象疾患（種類、重篤度など）、患者の年齢、体重、性別、既往歴、細胞の形態または種類などを考慮して、当業者が容易に決定することができる（神経内科治療ガイド、小川紀雄著、中外医学社 1994を参照）。本発明では、神経の再生が、p75シグナル伝達経路を遮断することによって（R h oポリペプチドの調節による）、神経突起伸展の障害が破壊されることによることが明らかになった。このようなシグナル伝達経路の遮断による神経再生の効果は従来知られておらず、したがって、本発明は、従来技術より優れた効果を示す。

#### 【0631】

1つの実施形態において、本発明において用いられるR h oポリペプチドをコードする

核酸分子、またはそのフラグメントもしくは改変体は、(a) 配列番号 5 に記載の塩基配列またはそのフラグメント配列を有する、ポリヌクレオチド；(b) 配列番号 6 に記載のアミノ酸配列またはそのフラグメントをコードする、ポリヌクレオチド、(c) 配列番号 6 に記載のアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が、置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも 1 つの変異を有する改変体ポリペプチドであって、生物学的活性を有する改変体ポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチド；(d) 配列番号 5 に記載の塩基配列のスプライス変異体または対立遺伝子変異体である、ポリヌクレオチド；(e) 配列番号 6 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドの種相同体をコードする、ポリヌクレオチド；(f) (a) ~ (e) のいずれか 1 つのポリヌクレオチドにストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；または (g) (a) ~ (e) のいずれか 1 つのポリヌクレオチドまたはその相補配列に対する同一性が少なくとも 70 % である塩基配列からなり、かつ、生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、からなる群より選択される、ポリヌクレオチド、を含む。

#### 【0632】

1 つの好ましい実施形態において、上記 (c) における置換、付加および欠失の数は、限定され、例えば、50 以下、40 以下、30 以下、20 以下、15 以下、10 以下、9 以下、8 以下、7 以下、6 以下、5 以下、4 以下、3 以下、2 以下であることが好ましい。より少ない数の置換、付加および欠失が好ましいが、生物学的活性を保持する（好ましくは、R h o 遺伝子産物と類似するかまたは実質的に同一の活性を有する）限り、多い数であってもよい。

#### 【0633】

別の好ましい実施形態において、上記改変体ポリペプチドが有する生物学的活性としては、例えば、配列番号 6 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドまたはそのフラグメントに対して特異的な抗体との相互作用、配列番号 6 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドまたはそのフラグメントに対して特異的な抗体との相互作用、P e p 5 との相互作用、p 7 5 との相互作用、G T 1 b との相互作用、M A G との相互作用、R h o G D I との相互作用などが挙げられるがそれらに限定されない。これらは例えば、免疫学的アッセイ、リン酸化定量などによって測定することができる。

#### 【0634】

別の好ましい実施形態において、(c) に記載の対立遺伝子変異体は、配列番号 5 に示す核酸配列と少なくとも 99 % の相同性を有することが有利である。

#### 【0635】

上記種相同体は、その種の遺伝子配列データベースが存在する場合、そのデータベースに対して、本発明の R h o（またはより好ましくは R h o A）をクエリ配列として検索することによって同定することができる。あるいは、本発明の R h o（またはより好ましくは R h o A）の全部または一部をプローブまたはプライマーとして、その種の遺伝子ライブラリーをスクリーニングすることによって同定することができる。そのような同定方法は、当該分野において周知であり、本明細書において記載される文献にも記載されている。種相同体は、例えば、配列番号 5 に示す核酸配列と少なくとも約 30 % の相同性を有することが好ましい。好ましくは、種相同体は、上記基準配列と、少なくとも約 40 %、少なくとも約 50 %、少なくとも約 60 %、少なくとも約 70 %、少なくとも約 80 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 98 %、相同であり得る。

#### 【0636】

好ましい実施形態において、上記 (a) ~ (e) のいずれか 1 つのポリヌクレオチドまたはその相補配列に対する同一性は、少なくとも約 80 % であり得、より好ましくは少なくとも約 90 % であり得、さらに好ましくは少なくとも約 98 % であり得、もっとも好ましくは少なくとも約 99 % であり得る。最も好ましくは、本発明の R h o は R h o A である。

#### 【0637】

好ましい実施形態において、本発明の R h o ポリペプチドをコードする核酸分子またはそのフラグメントおよび改変体は、少なくとも 8 の連続するヌクレオチド長であり得る。本発明の核酸分子は、本発明の使用目的によってその適切なヌクレオチド長が変動し得る。より好ましくは、本発明の核酸分子は、少なくとも 10 の連続するヌクレオチド長であり得、さらに好ましくは少なくとも 15 の連続するヌクレオチド長であり得、なお好ましくは少なくとも 20 の連続するヌクレオチド長であり得る。これらのヌクレオチド長の下限は、具体的に挙げた数字のほかに、それらの間の数（例えば、9、11、12、13、14、16 など）あるいは、それ以上の数（例えば、21、22、... 30、など）であってもよい。本発明の核酸分子は、目的とする用途（例えば、アンチセンス、RNA i、マーカー、プライマー、プローブ、所定の因子と相互作用し得ること）として使用することができる限り、その上限の長さは、配列番号 5 に示す配列の全長であってもよく、それを超える長さであってもよい。あるいは、プライマーとして使用する場合は、通常少なくとも約 8 のヌクレオチド長であり得、好ましくは約 10 ヌクレオチド長であり得る。プローブとして使用する場合は、通常少なくとも約 15 ヌクレオチド長であり得、好ましくは約 17 ヌクレオチド長であり得る。

#### 【0638】

1つの実施形態において、R h o ポリペプチドをコードする核酸分子、またはそのフラグメントもしくは改変体は、配列番号 5 の核酸配列の全範囲を含む。より好ましくは、R h o をコードする核酸分子、またはそのフラグメントもしくは改変体は、配列番号 5 の核酸配列の全範囲からなる。

#### 【0639】

1つの実施形態において、処置されるべき神経の疾患、障害または状態は、本明細書において他の場所において記載されており、例えば、アルツハイマー病、脊髄損傷、脳血管障害、脳外傷などを含む。好ましくは、本発明の組成物が対象とする神経の疾患、障害または状態は、アルツハイマー病であり得る。他に好ましい実施形態では、本発明の組成物が対象とする神経の疾患、障害または状態は、脊髄損傷、脳血管障害、脳外傷であり得る。

#### 【0640】

別の実施形態において、本発明の R h o ポリペプチドは、PTDドメインに結合していることが好ましい。そのような PTDドメイン結合型ポリペプチドをコードする核酸分子は、PTDドメインをコードする核酸配列を結合することによって遺伝子工学的または合成により作製することができる。

#### 【0641】

(R h o G D I ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子)

1つの局面において、本発明は、R h o G D I ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子を含む神経を再生するための組成物、および R h o G D I ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子を含む神経疾患、神経障害または神経の状態の、処置、予防、診断または予後のための組成物を提供する。ここで、再生、診断、予防、処置または予後上有効な量は、当該分野において周知の技法を用いて当業者が種々のパラメータを参酌しながら決定することができ、そのような量を決定するためには、例えば、使用目的、対象疾患（種類、重篤度など）、患者の年齢、体重、性別、既往歴、細胞の形態または種類などを考慮して、当業者が容易に決定することができる（神経内科治療ガイド、小川紀雄著、中外医学社 1994 を参照）。本発明では、神経の再生が、p75シグナル伝達経路を遮断することによって（R h o G D I ポリペプチドに特異的に相互作用する因子による）、神経突起伸展の障害が破壊されることによることが明らかになった。このようなシグナル伝達経路の遮断による神経再生の効果は従来知られておらず、したがって、本発明は、従来技術より優れた効果を示す。

#### 【0642】

1つの実施形態において、この因子は、(a) 配列番号 5 に記載の核酸配列のヌクレオチドもしくはそのフラグメントによってコードされる、ポリペプチド；(b) 配列番号 6

に記載のアミノ酸配列のアミノ酸もしくはそのフラグメントを有する、ポリペプチド；(c) 配列番号 6 に記載のアミノ酸配列のアミノ酸において、1 以上のアミノ酸が、置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも 1 つの変異を有する改変体ポリペプチドであって、生物学的活性を有する、改変体ポリペプチド；(d) 配列番号 5 に記載の塩基配列のヌクレオチドのスプライス改変体もしくは対立遺伝子改変体によってコードされる、ポリペプチド；(e) 配列番号 6 に記載のアミノ酸配列のアミノ酸を有するポリペプチドの、種相同体ポリペプチド；または (f) (a) ~ (e) のいずれか 1 つのポリペプチドのアミノ酸配列に対する同一性が少なくとも 70 % であるアミノ酸配列からなり、かつ、生物学的活性を有する、ポリペプチドに対して特異的に相互作用する、因子であり得る。

#### 【0643】

1 つの好ましい実施形態において、上記 (b) における置換、付加および欠失の数は限定されていてもよく、例えば、50 以下、40 以下、30 以下、20 以下、15 以下、10 以下、9 以下、8 以下、7 以下、6 以下、5 以下、4 以下、3 以下、2 以下であることが好ましい。より少ない数の置換、付加および欠失が好ましいが、生物学的活性を保持する（好ましくは、RhogDI 遺伝子産物と類似するかまたは実質的に同一の活性を有する）限り、多い数であってもよい。

#### 【0644】

好ましい実施形態において、本発明の因子は、核酸分子、ポリペプチド、脂質、糖鎖、有機低分子およびそれらの複合分子からなる群より選択される。

#### 【0645】

別の好ましい実施形態において、上記 (c) における対立遺伝子変異体は、配列番号 4 に示すアミノ酸配列と少なくとも 99 % の相同性を有することが好ましい。

#### 【0646】

別の好ましい実施形態において、上記種相同体は、本明細書中上述のように同定することができ、配列番号 6 に示すアミノ酸配列と少なくとも約 30 % の相同性を有することが好ましい。好ましくは、種相同体は、上記基準配列と、少なくとも約 40 %、少なくとも約 50 %、少なくとも約 60 %、少なくとも約 70 %、少なくとも約 80 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 98 %、相同であり得る。

#### 【0647】

別の好ましい実施形態において、上記 (e) における上記改変体ポリペプチドが有する生物学的活性としては、例えば、配列番号 6 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドまたはそのフラグメントに対して特異的な抗体との相互作用、p75 との相互作用などが挙げられるがそれらに限定されない。

#### 【0648】

好ましい実施形態において、上記 (a) ~ (d) のいずれか 1 つのポリペプチドに対する相同性は、少なくとも約 80 % であり得、より好ましくは少なくとも約 90 % であり得、さらに好ましくは少なくとも約 98 % であり得、もっとも好ましくは少なくとも約 99 % であり得る。

#### 【0649】

本発明の因子が特異的に相互作用するポリペプチドは、通常、少なくとも 3 の連続するアミノ酸配列を有する。本発明のポリペプチドが有するアミノ酸長は、目的とする用途に適合する限り、どれだけ短くてもよいが、好ましくは、より長い配列が使用され得る。従って、好ましくは、少なくとも 4 アミノ酸長、より好ましくは少なくとも 5 アミノ酸長、少なくとも 6 アミノ酸長、少なくとも 7 アミノ酸長、少なくとも 8 アミノ酸長、少なくとも 9 アミノ酸長、少なくとも 10 アミノ酸長であってもよい。さらに好ましくは少なくとも 15 アミノ酸長であり得、なお好ましくは少なくとも 20 アミノ酸長であり得る。これらのアミノ酸長の下限は、具体的に挙げた数字のほかに、それらの間の数（例えば、11、12、13、14、16 など）あるいは、それ以上の数（例えば、21、22、...、30、など）であってもよい。本発明の因子が特異的に相互作用するポリペプチドは、あ



る因子と相互作用することができる限り、その上限の長さは、配列番号 6 に示す配列の全長と同一であってもよく、それを超える長さであってもよい。

【0650】

好ましい実施形態において、本発明の因子は、核酸分子、ポリペプチド、脂質、糖鎖、有機低分子およびそれらの複合分子からなる群より選択される。より好ましくは、本発明の因子は、抗体またはその誘導體（例えば、単鎖抗体）である。従って、本発明の因子は、プローブおよび／またはインヒビターとして使用することができる。

【0651】

1つの実施形態において、Rho GDI ポリペプチド、またはそのフラグメントもしくは改変体は、配列番号 6 のアミノ酸配列の全範囲を含む。より好ましくは、Rho GDI ポリペプチド、またはそのフラグメントもしくは改変体は、配列番号 6 のアミノ酸の全範囲からなる。

【0652】

1つの実施形態において、処置されるべき神経の疾患、障害または状態は、本明細書において他の場所において記載されており、例えば、アルツハイマー病、脊髄損傷、脳血管障害、脳外傷などを含む。好ましくは、本発明の組成物が対象とする神経の疾患、障害または状態は、アルツハイマー病であり得る。他に好ましい実施形態では、本発明の組成物が対象とする神経の疾患、障害または状態は、脊髄損傷、脳血管障害、脳外傷であり得る。

【0653】

(Rho GDI ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子)

1つの局面において、本発明は、Rho GDI ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子を含む神経を再生するための組成物、および Rho GDI ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子を含む神経疾患、神経障害または神経の状態の、処置、予防、診断または予後のための組成物を提供する。ここで、再生、診断、予防、処置または予後上有効な量は、当該分野において周知の技法を用いて当業者が種々のパラメータを参酌しながら決定することができ、そのような量を決定するためには、例えば、使用目的、対象疾患（種類、重篤度など）、患者の年齢、体重、性別、既往歴、細胞の形態または種類などを考慮して、当業者が容易に決定することができる（神経内科治療ガイド、小川紀雄著、中外医学社 1994 を参照）。本発明では、神経の再生が、p75 シグナル伝達経路を遮断することによって（Rho GDI ポリペプチドに特異的に相互作用する因子による）、神経突起伸展の阻害が破壊されることによることが明らかになった。このようなシグナル伝達経路の遮断による神経再生の効果は従来知られておらず、したがって、本発明は、従来技術より優れた効果を示す。

【0654】

1つの実施形態において、この因子は、(a) 配列番号 5 に記載の塩基配列またはそのフラグメント配列を有するポリヌクレオチド；(b) 配列番号 6 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドまたはそのフラグメントをコードするポリヌクレオチド；(c) 配列番号 6 に記載のアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が、置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも 1 つの変異を有する改変体ポリペプチドであって、生物学的活性を有する改変体ポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチド；(d) 配列番号 5 に記載の塩基配列のスプライス変異体または対立遺伝子変異体である、ポリヌクレオチド；(e) 配列番号 6 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドの種相同体をコードする、ポリヌクレオチド；(f) (a) ~ (e) のいずれか 1 つのポリヌクレオチドにストリンジェント条件下でハイブリダイズし、かつ生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；または (g) (a) ~ (e) のいずれか 1 つのポリヌクレオチドまたはその相補配列に対する同一性が少なくとも 70 % である塩基配列からなり、かつ、生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、と特異的に相互作用する、因子であり得る。

## 【0655】

1つの好ましい実施形態において、上記(c)における置換、付加および欠失の数は、限定され、例えば、50以下、40以下、30以下、20以下、15以下、10以下、9以下、8以下、7以下、6以下、5以下、4以下、3以下、2以下であることが好ましい。より少ない数の置換、付加および欠失が好ましいが、生物学的活性を保持する（好ましくは、Rho GDI 遺伝子産物と類似するかまたは実質的に同一の活性を有する）限り、多い数であってもよい。

## 【0656】

別の好ましい実施形態において、上記改変体ポリペプチドが有する生物学的活性としては、例えば、配列番号6に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドまたはそのフラグメントに対して特異的な抗体との相互作用、p75との相互作用、p75によるRho GDIの機能調節の調節などが挙げられるがそれらに限定されない。これらは例えば、免疫学的アッセイ、リン酸化定量などによって測定することができる。

## 【0657】

別の好ましい実施形態において、上記(c)における対立遺伝子変異体は、配列番号5に示す核酸配列と少なくとも99%の相同性を有することが有利である。

## 【0658】

上記種相同体は、その種の遺伝子配列データベースが存在する場合、そのデータベースに対して、本発明のRho GDIをクエリ配列として検索することによって同定することができる。あるいは、本発明のRho GDIの全部または一部をプローブまたはプライマーとして、その種の遺伝子ライブラリーをスクリーニングすることによって同定することができる。そのような同定方法は、当該分野において周知であり、本明細書において記載される文献にも記載されている。種相同体は、例えば、配列番号5に示す核酸配列と少なくとも約30%の相同性を有することが好ましい。好ましくは、種相同体は、上記基準配列と、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約98%、相同であり得る。

## 【0659】

好ましい実施形態において、上記(a)～(e)のいずれか1つのポリヌクレオチドまたはその相補配列に対する同一性は、少なくとも約80%であり得、より好ましくは少なくとも約90%であり得、さらに好ましくは少なくとも約98%であり得、もっとも好ましくは少なくとも約99%であり得る。

## 【0660】

好ましい実施形態において、本発明のRho GDIをコードする核酸分子またはそのフラグメントおよび改変体は、少なくとも8の連続するヌクレオチド長であり得る。本発明の核酸分子は、本発明の使用目的によってその適切なヌクレオチド長が変動し得る。より好ましくは、本発明の核酸分子は、少なくとも10の連続するヌクレオチド長であり得、さらに好ましくは少なくとも15の連続するヌクレオチド長であり得、なお好ましくは少なくとも20の連続するヌクレオチド長であり得る。これらのヌクレオチド長の下限は、具体的に挙げた数字のほかに、それらの間の数（例えば、9、11、12、13、14、16など）あるいは、それ以上の数（例えば、21、22、... 30、など）であってもよい。本発明の核酸分子は、目的とする用途（例えば、アンチセンス、RNAi、マーカー、プライマー、プローブ、所定の因子と相互作用し得ること）として使用することができる限り、その上限の長さは、配列番号5に示す配列の全長であってもよく、それを超える長さであってもよい。あるいは、プライマーとして使用する場合は、通常少なくとも約8のヌクレオチド長であり得、好ましくは約10ヌクレオチド長であり得る。プローブとして使用する場合は、通常少なくとも約15ヌクレオチド長であり得、好ましくは約17ヌクレオチド長であり得る。

## 【0661】

1つの実施形態において、Rho GDI ポリペプチドをコードする核酸分子、または

そのフラグメントもしくは改変体は、配列番号5の核酸配列の全範囲を含む。より好ましくは、Rho GDIポリペプチドをコードする核酸分子、またはそのフラグメントもしくは改変体は、配列番号5の核酸配列の全範囲からなる。

#### 【0662】

1つの実施形態において、処置されるべき神経の疾患、障害または状態は、本明細書において他の場所において記載されており、例えば、アルツハイマー病、脊髄損傷、脳血管障害、脳外傷などを含む。好ましくは、本発明の組成物が対象とする神経の疾患、障害または状態は、アルツハイマー病であり得る。他に好ましい実施形態では、本発明の組成物が対象とする神経の疾患、障害または状態は、脊髄損傷、脳血管障害、脳外傷であり得る。

#### 【0663】

好ましい実施形態において、本発明の因子は、核酸分子、ポリペプチド、脂質、糖鎖、有機低分子およびそれらの複合分子からなる群より選択される。

#### 【0664】

好ましい実施形態では、本発明の因子は、核酸分子である。本発明の因子が核酸分子である場合、そのような核酸分子は、少なくとも8の連続するヌクレオチド長であり得る。本発明の核酸分子は、本発明の使用目的によってその適切なヌクレオチド長が変動し得る。より好ましくは、本発明の核酸分子は、少なくとも10の連続するヌクレオチド長であり得、さらに好ましくは少なくとも15の連続するヌクレオチド長であり得、なお好ましくは少なくとも20の連続するヌクレオチド長であり得る。これらのヌクレオチド長の下限は、具体的に挙げた数字のほかに、それらの間の数（例えば、9、11、12、13、14、16など）あるいは、それ以上の数（例えば、21、22、... 30、など）であってもよい。本発明の核酸分子は、目的とする用途（例えば、アンチセンス、RNAi、マーカー、プライマー、プローブ、所定の因子と相互作用し得ること）として使用することができる限り、その上限の長さは、配列番号5に示す配列の全長であってもよく、それを超える長さであってもよい。あるいは、プライマーとして使用する場合は、通常少なくとも約8のヌクレオチド長であり得、好ましくは約10ヌクレオチド長であり得る。プローブとして使用する場合は、通常少なくとも約15ヌクレオチド長であり得、好ましくは約17ヌクレオチド長であり得る。

#### 【0665】

従って、1つの例示的な実施形態において、本発明の因子は、上記(a)～(g)のいずれかのポリヌクレオチドの核酸配列に対して相補的な配列またはそれに対して少なくとも70%の同一性を有する配列を有する核酸分子であり得る。

#### 【0666】

別の例示的な実施形態において、本発明の因子は、(a)～(g)のいずれかのポリヌクレオチドの核酸配列に対してストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸分子であり得る。

#### 【0667】

別の好ましい実施形態では、本発明の因子は、アンチセンスまたはRNAiである。RNAiは、siRNAであってもshRNAであってもよく、そのような例としては、たとえば、約20塩基前後（例えば、代表的には約21～23塩基長）またはそれ未満の長さの二本鎖RNAであって、好ましくは、5'ーリン酸、3'ーOHの構造を有しており、3'末端は約2塩基突出している。shRNAはまた、好ましくは、3'突出末端を有し得る。二本鎖部分の長さは特に限定されないが、好ましくは約10ヌクレオチド長以上、より好ましくは約20ヌクレオチド長以上であり得る。ここで、3'突出末端は、好ましくはDNAであり得、より好ましくは少なくとも2ヌクレオチド長以上のDNAであり得、さらに好ましくは2～4ヌクレオチド長のDNAであり得る。

#### 【0668】

(MAGのポリペプチド形態に特異的な因子)

1つの局面において、本発明は、MAGポリペプチドをコードする核酸分子に対して特

異的に相互作用する因子を含む神経を再生するための組成物、およびMAGポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子を含む神経疾患、神経障害または神経の状態の、処置、予防、診断または予後のための組成物を提供する。ここで、再生、診断、予防、処置または予後上有効な量は、当該分野において周知の技法を用いて当業者が種々のパラメータを参酌しながら決定することができ、そのような量を決定するためには、例えば、使用目的、対象疾患（種類、重篤度など）、患者の年齢、体重、性別、既往歴、細胞の形態または種類などを考慮して、当業者が容易に決定することができる（神経内科治療ガイド、小川紀雄著、中外医学社 1994を参照）。本発明では、神経の再生が、p 75シグナル伝達経路を遮断することによって（MAGポリペプチドに特異的に相互作用する（たとえば、阻害または抑制する）因子による）、神経突起伸展の阻害が破壊されることによることが明らかになった。このようなシグナル伝達経路の遮断による神経再生の効果は従来知られておらず、したがって、本発明は、従来技術より優れた効果を示す。

#### 【0669】

1つの実施形態において、この因子は、（a）配列番号7に記載の核酸配列のヌクレオチドもしくはそのフラグメントによってコードされる、ポリペプチド；（b）配列番号8に記載のアミノ酸配列のアミノ酸もしくはそのフラグメントを有する、ポリペプチド；（c）配列番号8に記載のアミノ酸配列のアミノ酸において、1以上のアミノ酸が、置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも1つの変異を有する改変体ポリペプチドであって、生物学的活性を有する、改変体ポリペプチド；（d）配列番号7に記載の塩基配列のヌクレオチドのスプライス改変体もしくは対立遺伝子改変体によってコードされる、ポリペプチド；（e）配列番号8に記載のアミノ酸配列のアミノ酸を有するポリペプチドの、種相同体ポリペプチド；または（f）（a）～（e）のいずれか1つのポリペプチドのアミノ酸配列に対する同一性が少なくとも70%であるアミノ酸配列からなり、かつ、生物学的活性を有する、ポリペプチドに対して特異的に相互作用する、因子であり得る。

#### 【0670】

1つの好ましい実施形態において、上記（b）における置換、付加および欠失の数は限定されていてもよく、例えば、50以下、40以下、30以下、20以下、15以下、10以下、9以下、8以下、7以下、6以下、5以下、4以下、3以下、2以下であることが好ましい。より少ない数の置換、付加および欠失が好ましいが、生物学的活性を保持する（好ましくは、MAG遺伝子産物と類似するかまたは実質的に同一の活性を有する）限り、多い数であってもよい。

#### 【0671】

好ましい実施形態において、本発明の因子は、核酸分子、ポリペプチド、脂質、糖鎖、有機低分子およびそれらの複合分子からなる群より選択される。

#### 【0672】

別の好ましい実施形態において、上記（c）における対立遺伝子変異体は、配列番号4に示すアミノ酸配列と少なくとも99%の相同性を有することが好ましい。

#### 【0673】

別の好ましい実施形態において、上記種相同体は、本明細書中上述のように同定することができ、配列番号8に示すアミノ酸配列と少なくとも約30%の相同性を有することが好ましい。好ましくは、種相同体は、上記基準配列と、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約98%、相同であり得る。

#### 【0674】

別の好ましい実施形態において、上記（e）における上記改変体ポリペプチドが有する生物学的活性としては、例えば、配列番号8に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドまたはそのフラグメントに対して特異的な抗体との相互作用、p 75との相互作用などが挙げられるがそれらに限定されない。

## 【0675】

好ましい実施形態において、上記 (a) ~ (d) のいずれか 1 つのポリペプチドに対する相同性は、少なくとも約 80% であり得、より好ましくは少なくとも約 90% であり得、さらに好ましくは少なくとも約 98% であり得、もっとも好ましくは少なくとも約 99% であり得る。

## 【0676】

本発明の因子が特異的に相互作用するポリペプチドは、通常、少なくとも 3 の連続するアミノ酸配列を有する。本発明のポリペプチドが有するアミノ酸長は、目的とする用途に適合する限り、どれだけ短くてもよいが、好ましくは、より長い配列が使用され得る。従って、好ましくは、少なくとも 4 アミノ酸長、より好ましくは少なくとも 5 アミノ酸長、少なくとも 6 アミノ酸長、少なくとも 7 アミノ酸長、少なくとも 8 アミノ酸長、少なくとも 9 アミノ酸長、少なくとも 10 アミノ酸長であってもよい。さらに好ましくは少なくとも 15 アミノ酸長であり得、なお好ましくは少なくとも 20 アミノ酸長であり得る。これらのアミノ酸長の下限は、具体的に挙げた数字のほかに、それらの間の数（例えば、11、12、13、14、16 など）あるいは、それ以上の数（例えば、21、22、...、30、など）であってもよい。本発明の因子が特異的に相互作用するポリペプチドは、ある因子と相互作用することができる限り、その上限の長さは、配列番号 8 に示す配列の全長と同一であってもよく、それを超える長さであってもよい。

## 【0677】

好ましい実施形態において、本発明の因子は、核酸分子、ポリペプチド、脂質、糖鎖、有機低分子およびそれらの複合分子からなる群より選択される。より好ましくは、本発明の因子は、抗体またはその誘導体（例えば、単鎖抗体）である。従って、本発明の因子は、プローブおよび／またはインヒビターとして使用することができる。

## 【0678】

1 つの実施形態において、MAG ポリペプチド、またはそのフラグメントもしくは改変体は、配列番号 8 のアミノ酸配列の 1 位 ~ 626 位を含む。より好ましくは、MAG ポリペプチド、またはそのフラグメントもしくは改変体は、配列番号 8 のアミノ酸の全配列からなる。

## 【0679】

1 つの実施形態において、処置されるべき神経の疾患、障害または状態は、本明細書において他の場所において記載されており、例えば、アルツハイマー病、脊髄損傷、脳血管障害、脳外傷などを含む。好ましくは、本発明の組成物が対象とする神経の疾患、障害または状態は、アルツハイマー病であり得る。他に好ましい実施形態では、本発明の組成物が対象とする神経の疾患、障害または状態は、脊髄損傷、脳血管障害、脳外傷であり得る。

## 【0680】

(MAG ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子)

1 つの局面において、本発明は、MAG ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子を含む神経を再生するための組成物、および MAG ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子を含む神経疾患、神経障害または神経の状態の、処置、予防、診断または予後のための組成物を提供する。ここで、再生、診断、予防、処置または予後上有効な量は、当該分野において周知の技法を用いて当業者が種々のパラメータを参酌しながら決定することができ、そのような量を決定するためには、例えば、使用目的、対象疾患（種類、重篤度など）、患者の年齢、体重、性別、既往歴、細胞の形態または種類などを考慮して、当業者が容易に決定することができる（神経内科治療ガイド、小川紀雄著、中外医学社 1994 を参照）。本発明では、神経の再生が、p75 シグナル伝達経路を遮断することによって（MAG ポリペプチドに特異的に相互作用する因子による）、神経突起伸展の障害が破壊されることによることが明らかになった。このようなシグナル伝達経路の遮断による神経再生の効果は従来知られておらず、したがって、本発明は、従来技術より優れた効果を示す。

**【0681】**

1つの実施形態において、この因子は、(a) 配列番号7に記載の塩基配列またはそのフラグメント配列を有するポリヌクレオチド；(b) 配列番号8に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドまたはそのフラグメントをコードするポリヌクレオチド；(c) 配列番号8に記載のアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が、置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも1つの変異を有する改変体ポリペプチドであって、生物学的活性を有する改変体ポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチド；(d) 配列番号7に記載の塩基配列のスプライス変異体または対立遺伝子変異体である、ポリヌクレオチド；(e) 配列番号8に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドの種相同体をコードする、ポリヌクレオチド；(f) (a)～(e)のいずれか1つのポリヌクレオチドにストリンジェント条件下でハイブリダイズし、かつ生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；または(g) (a)～(e)のいずれか1つのポリヌクレオチドまたはその相補配列に対する同一性が少なくとも70%である塩基配列からなり、かつ、生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、と特異的に相互作用する、因子であり得る。

**【0682】**

1つの好ましい実施形態において、上記(c)における置換、付加および欠失の数は、限定され、例えば、50以下、40以下、30以下、20以下、15以下、10以下、9以下、8以下、7以下、6以下、5以下、4以下、3以下、2以下であることが好ましい。より少ない数の置換、付加および欠失が好ましいが、生物学的活性を保持する（好ましくは、MAG遺伝子産物と類似するかまたは実質的に同一の活性を有する）限り、多い数であってもよい。

**【0683】**

別の好ましい実施形態において、上記改変体ポリペプチドが有する生物学的活性としては、例えば、配列番号8に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドまたはそのフラグメントに対して特異的な抗体との相互作用、p75との相互作用、p75によるMAGの機能調節の調節などが挙げられるがそれらに限定されない。これらは例えば、免疫学的アッセイ、リン酸化定量などによって測定することができる。

**【0684】**

別の好ましい実施形態において、上記(c)における対立遺伝子変異体は、配列番号7に示す核酸配列と少なくとも99%の相同性を有することが有利である。

**【0685】**

上記種相同体は、その種の遺伝子配列データベースが存在する場合、そのデータベースに対して、本発明のMAGをクエリ配列として検索することによって同定することができる。あるいは、本発明のMAGの全部または一部をプローブまたはプライマーとして、その種の遺伝子ライブラリーをスクリーニングすることによって同定することができる。そのような同定方法は、当該分野において周知であり、本明細書において記載される文献にも記載されている。種相同体は、例えば、配列番号7に示す核酸配列と少なくとも約30%の相同性を有することが好ましい。好ましくは、種相同体は、上記基準配列と、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約98%、相同であり得る。

**【0686】**

好ましい実施形態において、上記(a)～(e)のいずれか1つのポリヌクレオチドまたはその相補配列に対する同一性は、少なくとも約80%であり得、より好ましくは少なくとも約90%であり得、さらに好ましくは少なくとも約98%であり得、もっとも好ましくは少なくとも約99%であり得る。

**【0687】**

好ましい実施形態において、本発明のMAGをコードする核酸分子またはそのフラグメントおよび改変体は、少なくとも8の連続するヌクレオチド長であり得る。本発明の核酸

分子は、本発明の使用目的によってその適切なヌクレオチド長が変動し得る。より好ましくは、本発明の核酸分子は、少なくとも10の連続するヌクレオチド長であり得、さらに好ましくは少なくとも15の連続するヌクレオチド長であり得、なお好ましくは少なくとも20の連続するヌクレオチド長であり得る。これらのヌクレオチド長の下限は、具体的に挙げた数字のほかに、それらの間の数（例えば、9、11、12、13、14、16など）あるいは、それ以上の数（例えば、21、22、... 30、など）であってもよい。本発明の核酸分子は、目的とする用途（例えば、アンチセンス、RNAi、マーカー、プライマー、プローブ、所定の因子と相互作用し得ること）として使用することができる限り、その上限の長さは、配列番号7に示す配列の全長であってもよく、それを超える長さであってもよい。あるいは、プライマーとして使用する場合は、通常少なくとも約8のヌクレオチド長であり得、好ましくは約10ヌクレオチド長であり得る。プローブとして使用する場合は、通常少なくとも約15ヌクレオチド長であり得、好ましくは約17ヌクレオチド長であり得る。

#### 【0688】

1つの実施形態において、MAGポリペプチドをコードする核酸分子、またはそのフラグメントもしくは改変体は、配列番号7の核酸配列の全範囲を含む。より好ましくは、MAGポリペプチドをコードする核酸分子、またはそのフラグメントもしくは改変体は、配列番号7の核酸配列の全範囲からなる。

#### 【0689】

1つの実施形態において、処置されるべき神経の疾患、障害または状態は、本明細書において他の場所において記載されており、例えば、アルツハイマー病、脊髄損傷、脳血管障害、脳外傷などを含む。好ましくは、本発明の組成物が対象とする神経の疾患、障害または状態は、アルツハイマー病であり得る。他に好ましい実施形態では、本発明の組成物が対象とする神経の疾患、障害または状態は、脊髄損傷、脳血管障害、脳外傷であり得る。

#### 【0690】

好ましい実施形態において、本発明の因子は、核酸分子、ポリペプチド、脂質、糖鎖、有機低分子およびそれらの複合分子からなる群より選択される。

#### 【0691】

好ましい実施形態では、本発明の因子は、核酸分子である。本発明の因子が核酸分子である場合、そのような核酸分子は、少なくとも8の連続するヌクレオチド長であり得る。本発明の核酸分子は、本発明の使用目的によってその適切なヌクレオチド長が変動し得る。より好ましくは、本発明の核酸分子は、少なくとも10の連続するヌクレオチド長であり得、さらに好ましくは少なくとも15の連続するヌクレオチド長であり得、なお好ましくは少なくとも20の連続するヌクレオチド長であり得る。これらのヌクレオチド長の下限は、具体的に挙げた数字のほかに、それらの間の数（例えば、9、11、12、13、14、16など）あるいは、それ以上の数（例えば、21、22、... 30、など）であってもよい。本発明の核酸分子は、目的とする用途（例えば、アンチセンス、RNAi、マーカー、プライマー、プローブ）として使用することができるかまたは所定の因子と相互作用することができる限り、その上限の長さは、配列番号7に示す配列の全長であってもよく、それを超える長さであってもよい。あるいは、プライマーとして使用する場合は、通常少なくとも約8のヌクレオチド長であり得、好ましくは約10ヌクレオチド長であり得る。プローブとして使用する場合は、通常少なくとも約15ヌクレオチド長であり得、好ましくは約17ヌクレオチド長であり得る。

#### 【0692】

従って、1つの例示的な実施形態において、本発明の因子は、上記(a)～(g)のいずれかのポリヌクレオチドの核酸配列に対して相補的な配列またはそれに対して少なくとも70%の同一性を有する配列を有する核酸分子であり得る。

#### 【0693】

別の例示的な実施形態において、本発明の因子は、(a)～(g)のいずれかのポリヌ

クレオチドの核酸配列に対してストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸分子であり得る。ストリンジェンシーは、高くても、中程度であっても、低くてもよく、程度は、当業者が適宜状況に応じて決定することができる。

#### 【0694】

別の好ましい実施形態では、本発明の因子は、アンチセンスまたはRNAiである。RNAiは、siRNAであってもshRNAであってもよく、そのような例としては、たとえば、約20塩基前後（例えば、代表的には約21～23塩基長）またはそれ未満の長さの二本鎖RNAであって、好ましくは、5' -リン酸、3' -OHの構造を有しており、3' 末端は約2塩基突出している。shRNAはまた、好ましくは、3' 突出末端を有し得る。二本鎖部分の長さは特に限定されないが、好ましくは約10ヌクレオチド長以上、より好ましくは約20ヌクレオチド長以上であり得る。ここで、3' 突出末端は、好ましくはDNAであり得、より好ましくは少なくとも2ヌクレオチド長以上のDNAであり得、さらに好ましくは2～4ヌクレオチド長のDNAであり得る。

#### 【0695】

(Nogoのポリペプチド形態に特異的な因子)

1つの局面において、本発明は、Nogoポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子を含む神経を再生するための組成物、およびNogoポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子を含む神経疾患、神経障害または神経の状態の、処置、予防、診断または予後のための組成物を提供する。ここで、再生、診断、予防、処置または予後上有効な量は、当該分野において周知の技法を用いて当業者が種々のパラメータを参酌しながら決定することができ、そのような量を決定するためには、例えば、使用目的、対象疾患（種類、重篤度など）、患者の年齢、体重、性別、既往歴、細胞の形態または種類などを考慮して、当業者が容易に決定することができる（神経内科治療ガイド、小川紀雄著、中外医学社 1994を参照）。本発明では、神経の再生が、p75シグナル伝達経路を遮断することによって（Nogoポリペプチドに特異的に相互作用する（たとえば、阻害または抑制する）因子による）、神経突起伸展の阻害が破壊されることによることが明らかになった。このようなシグナル伝達経路の遮断による神経再生の効果は従来知られておらず、したがって、本発明は、従来技術より優れた効果を示す。

#### 【0696】

1つの実施形態において、この因子は、(a) 配列番号9に記載の核酸配列のヌクレオチドもしくはそのフラグメントによってコードされる、ポリペプチド；(b) 配列番号10に記載のアミノ酸配列のアミノ酸もしくはそのフラグメントを有する、ポリペプチド；(c) 配列番号10に記載のアミノ酸配列のアミノ酸において、1以上のアミノ酸が、置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも1つの変異を有する改変体ポリペプチドであって、生物学的活性を有する、改変体ポリペプチド；(d) 配列番号9に記載の塩基配列のヌクレオチドのスプライス改変体もしくは対立遺伝子改変体によってコードされる、ポリペプチド；(e) 配列番号10に記載のアミノ酸配列のアミノ酸を有するポリペプチドの、種相同体ポリペプチド；または(f) (a)～(e)のいずれか1つのポリペプチドのアミノ酸配列に対する同一性が少なくとも70%であるアミノ酸配列からなり、かつ、生物学的活性を有する、ポリペプチドに対して特異的に相互作用する、因子であり得る。

#### 【0697】

1つの好ましい実施形態において、上記(b)における置換、付加および欠失の数は限定されていてもよく、例えば、50以下、40以下、30以下、20以下、15以下、10以下、9以下、8以下、7以下、6以下、5以下、4以下、3以下、2以下であることが好ましい。より少ない数の置換、付加および欠失が好ましいが、生物学的活性を保持する（好ましくは、Nogo遺伝子産物と類似するかまたは実質的に同一の活性を有する）限り、多い数であってもよい。

#### 【0698】



好ましい実施形態において、本発明の因子は、核酸分子、ポリペプチド、脂質、糖鎖、有機低分子およびそれらの複合分子からなる群より選択される。

【0699】

別の好ましい実施形態において、上記(c)における対立遺伝子変異体は、配列番号4に示すアミノ酸配列と少なくとも99%の相同性を有することが好ましい。

【0700】

別の好ましい実施形態において、上記種相同体は、本明細書中上述のように同定することができ、配列番号10に示すアミノ酸配列と少なくとも約30%の相同性を有することが好ましい。好ましくは、種相同体は、上記基準配列と、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約98%、相同であり得る。

【0701】

別の好ましい実施形態において、上記(e)における上記改変体ポリペプチドが有する生物学的活性としては、例えば、配列番号10に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドまたはそのフラグメントに対して特異的な抗体との相互作用、p75との相互作用などが挙げられるがそれらに限定されない。

【0702】

好ましい実施形態において、上記(a)～(d)のいずれか1つのポリペプチドに対する相同性は、少なくとも約80%であり得、より好ましくは少なくとも約90%であり得、さらに好ましくは少なくとも約98%であり得、もっとも好ましくは少なくとも約99%であり得る。

【0703】

本発明の因子が特異的に相互作用するポリペプチドは、通常、少なくとも3の連続するアミノ酸配列を有する。本発明のポリペプチドが有するアミノ酸長は、目的とする用途に適合する限り、どれだけ短くてもよいが、好ましくは、より長い配列が使用され得る。従って、好ましくは、少なくとも4アミノ酸長、より好ましくは少なくとも5アミノ酸長、少なくとも6アミノ酸長、少なくとも7アミノ酸長、少なくとも8アミノ酸長、少なくとも9アミノ酸長、少なくとも10アミノ酸長であってもよい。さらに好ましくは少なくとも15アミノ酸長であり得、なお好ましくは少なくとも20アミノ酸長であり得る。これらのアミノ酸長の下限は、具体的に挙げた数字のほかに、それらの間の数(例えば、11、12、13、14、16など)あるいは、それ以上の数(例えば、21、22、...、30、など)であってもよい。本発明の因子が特異的に相互作用するポリペプチドは、ある因子と相互作用することができる限り、その上限の長さは、配列番号10に示す配列の全長と同一であってもよく、それを超える長さであってもよい。

【0704】

好ましい実施形態において、本発明の因子は、核酸分子、ポリペプチド、脂質、糖鎖、有機低分子およびそれらの複合分子からなる群より選択される。より好ましくは、本発明の因子は、抗体またはその誘導体(例えば、単鎖抗体)である。従って、本発明の因子は、プローブおよび/またはインヒビターとして使用することができる。

【0705】

1つの実施形態において、Nogopoliポリペプチド、またはそのフラグメントもしくは改変体は、配列番号10のアミノ酸配列の1位～626位を含む。より好ましくは、Nogopoliポリペプチド、またはそのフラグメントもしくは改変体は、配列番号10のアミノ酸の全配列からなる。

【0706】

1つの実施形態において、処置されるべき神経の疾患、障害または状態は、本明細書において他の場所において記載されており、例えば、アルツハイマー病、脊髄損傷、脳血管障害、脳外傷などを含む。好ましくは、本発明の組成物が対象とする神経の疾患、障害または状態は、アルツハイマー病であり得る。他に好ましい実施形態では、本発明の組成物が対象とする神経の疾患、障害または状態は、脊髄損傷、脳血管障害、脳外傷であり得る。

## 【0707】

(Nogopoliペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子)

1つの局面において、本発明は、Nogopoliペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子を含む神経を再生するための組成物、およびNogopoliペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子を含む神経疾患、神経障害または神経の状態の、処置、予防、診断または予後のための組成物を提供する。ここで、再生、診断、予防、処置または予後上有効な量は、当該分野において周知の技法を用いて当業者が種々のパラメータを参酌しながら決定することができ、そのような量を決定するためには、例えば、使用目的、対象疾患（種類、重篤度など）、患者の年齢、体重、性別、既往歴、細胞の形態または種類などを考慮して、当業者が容易に決定することができる（神経内科治療ガイド、小川紀雄著、中外医学社 1994を参照）。本発明では、神経の再生が、p75シグナル伝達経路を遮断することによって（Nogopoliペプチドに特異的に相互作用する因子による）、神経突起伸展の阻害が破壊されることによることが明らかになった。このようなシグナル伝達経路の遮断による神経再生の効果は従来知られておらず、したがって、本発明は、従来技術より優れた効果を示す。

## 【0708】

1つの実施形態において、この因子は、(a) 配列番号9に記載の塩基配列またはそのフラグメント配列を有するポリヌクレオチド；(b) 配列番号10に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドまたはそのフラグメントをコードするポリヌクレオチド；(c) 配列番号10に記載のアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が、置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも1つの変異を有する改変体ポリペプチドであって、生物学的活性を有する改変体ポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチド；(d) 配列番号9に記載の塩基配列のスプライス変異体または対立遺伝子変異体である、ポリヌクレオチド；(e) 配列番号10に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドの種相同体をコードする、ポリヌクレオチド；(f) (a)～(e)のいずれか1つのポリヌクレオチドにストリンジェント条件下でハイブリダイズし、かつ生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；または(g) (a)～(e)のいずれか1つのポリヌクレオチドまたはその相補配列に対する同一性が少なくとも70%である塩基配列からなり、かつ、生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、と特異的に相互作用する、因子であり得る。

## 【0709】

1つの好ましい実施形態において、上記(c)における置換、付加および欠失の数は、限定され、例えば、50以下、40以下、30以下、20以下、15以下、10以下、9以下、8以下、7以下、6以下、5以下、4以下、3以下、2以下であることが好ましい。より少ない数の置換、付加および欠失が好ましいが、生物学的活性を保持する（好ましくは、Nogo遺伝子産物と類似するかまたは実質的に同一の活性を有する）限り、多い数であってもよい。

## 【0710】

別の好ましい実施形態において、上記改変体ポリペプチドが有する生物学的活性としては、例えば、配列番号10に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドまたはそのフラグメントに対して特異的な抗体との相互作用、p75との相互作用、p75によるNogoの機能調節の調節などが挙げられるがそれらに限定されない。これらは例えば、免疫学的アッセイ、リン酸化定量などによって測定することができる。

## 【0711】

別の好ましい実施形態において、上記(c)における対立遺伝子変異体は、配列番号9に示す核酸配列と少なくとも99%の相同性を有することが有利である。

## 【0712】

上記種相同体は、その種の遺伝子配列データベースが存在する場合、そのデータベースに対して、本発明のNogoをクエリ配列として検索することによって同定することがで

きる。あるいは、本発明の N o g o の全部または一部をプローブまたはプライマーとして、その種の遺伝子ライブラリーをスクリーニングすることによって同定することができる。そのような同定方法は、当該分野において周知であり、本明細書において記載される文献にも記載されている。種相同体は、例えば、配列番号 9 に示す核酸配列と少なくとも約 30% の相同性を有することが好ましい。好ましくは、種相同体は、上記基準配列と、少なくとも約 40%、少なくとも約 50%、少なくとも約 60%、少なくとも約 70%、少なくとも約 80%、少なくとも約 90%、少なくとも約 95%、少なくとも約 98%、相同であり得る。

【0713】

好ましい実施形態において、上記 (a) ~ (e) のいずれか 1 つのポリヌクレオチドまたはその相補配列に対する同一性は、少なくとも約 80% であり得、より好ましくは少なくとも約 90% であり得、さらに好ましくは少なくとも約 98% であり得、もっとも好ましくは少なくとも約 99% であり得る。

【0714】

好ましい実施形態において、本発明の N o g o をコードする核酸分子またはそのフラグメントおよび改変体は、少なくとも 8 の連続するヌクレオチド長であり得る。本発明の核酸分子は、本発明の使用目的によってその適切なヌクレオチド長が変動し得る。より好ましくは、本発明の核酸分子は、少なくとも 10 の連続するヌクレオチド長であり得、さらに好ましくは少なくとも 15 の連続するヌクレオチド長であり得、なお好ましくは少なくとも 20 の連続するヌクレオチド長であり得る。これらのヌクレオチド長の下限は、具体的に挙げた数字のほかに、それらの間の数 (例えば、9、11、12、13、14、16 など) あるいは、それ以上の数 (例えば、21、22、... 30、など) であってもよい。本発明の核酸分子は、目的とする用途 (例えば、アンチセンス、RNA i、マーカー、プライマー、プローブ、所定の因子と相互作用し得ること) として使用することができる限り、その上限の長さは、配列番号 9 に示す配列の全長であってもよく、それを超える長さであってもよい。あるいは、プライマーとして使用する場合は、通常少なくとも約 8 のヌクレオチド長であり得、好ましくは約 10 ヌクレオチド長であり得る。プローブとして使用する場合は、通常少なくとも約 15 ヌクレオチド長であり得、好ましくは約 17 ヌクレオチド長であり得る。

【0715】

1 つの実施形態において、N o g o ポリペプチドをコードする核酸分子、またはそのフラグメントもしくは改変体は、配列番号 9 の核酸配列の全範囲を含む。より好ましくは、N o g o ポリペプチドをコードする核酸分子、またはそのフラグメントもしくは改変体は、配列番号 9 の核酸配列の全範囲からなる。

【0716】

1 つの実施形態において、処置されるべき神経の疾患、障害または状態は、本明細書において他の場所において記載されており、例えば、アルツハイマー病、脊髄損傷、脳血管障害、脳外傷などを含む。好ましくは、本発明の組成物が対象とする神経の疾患、障害または状態は、アルツハイマー病であり得る。他に好ましい実施形態では、本発明の組成物が対象とする神経の疾患、障害または状態は、脊髄損傷、脳血管障害、脳外傷であり得る。

【0717】

好ましい実施形態において、本発明の因子は、核酸分子、ポリペプチド、脂質、糖鎖、有機低分子およびそれらの複合分子からなる群より選択される。

【0718】

好ましい実施形態では、本発明の因子は、核酸分子である。本発明の因子が核酸分子である場合、そのような核酸分子は、少なくとも 8 の連続するヌクレオチド長であり得る。本発明の核酸分子は、本発明の使用目的によってその適切なヌクレオチド長が変動し得る。より好ましくは、本発明の核酸分子は、少なくとも 10 の連続するヌクレオチド長であり得、さらに好ましくは少なくとも 15 の連続するヌクレオチド長であり得、なお好まし

くは少なくとも20の連続するヌクレオチド長であり得る。これらのヌクレオチド長の下限は、具体的に挙げた数字のほかに、それらの間の数（例えば、9、11、12、13、14、16など）あるいは、それ以上の数（例えば、21、22、... 30、など）であってもよい。本発明の核酸分子は、目的とする用途（例えば、アンチセンス、RNAi、マーカー、プライマー、プローブ）として使用することができるかまたは所定の因子と相互作用することができる限り、その上限の長さは、配列番号9に示す配列の全長であってもよく、それを超える長さであってもよい。あるいは、プライマーとして使用する場合は、通常少なくとも約8のヌクレオチド長であり得、好ましくは約10ヌクレオチド長であり得る。プローブとして使用する場合は、通常少なくとも約15ヌクレオチド長であり得、好ましくは約17ヌクレオチド長であり得る。

#### 【0719】

従って、1つの例示的な実施形態において、本発明の因子は、上記(a)～(g)のいずれかのポリヌクレオチドの核酸配列に対して相補的な配列またはそれに対して少なくとも70%の同一性を有する配列を有する核酸分子であり得る。

#### 【0720】

別の例示的な実施形態において、本発明の因子は、(a)～(g)のいずれかのポリヌクレオチドの核酸配列に対してストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸分子であり得る。ストリンジェンシーは、高くても、中程度であっても、低くてもよく、程度は、当業者が適宜状況に応じて決定することができる。

#### 【0721】

別の好ましい実施形態では、本発明の因子は、アンチセンスまたはRNAiである。RNAiは、siRNAであってもshRNAであってもよく、そのような例としては、たとえば、約20塩基前後（例えば、代表的には約21～23塩基長）またはそれ未満の長さの二本鎖RNAであって、好ましくは、5'-リン酸、3'-OHの構造を有しており、3'末端は約2塩基突出している。shRNAはまた、好ましくは、3'突出末端を有し得る。二本鎖部分の長さは特に限定されないが、好ましくは約10ヌクレオチド長以上、より好ましくは約20ヌクレオチド長以上であり得る。ここで、3'突出末端は、好ましくはDNAであり得、より好ましくは少なくとも2ヌクレオチド長以上のDNAであり得、さらに好ましくは2～4ヌクレオチド長のDNAであり得る。

#### 【0722】

(Rhoのポリペプチド形態に特異的に相互作用する因子)

1つの局面において、本発明は、Rhoポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子を含む神経を再生するための組成物、およびRhoポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子を含む神経疾患、神経障害または神経の状態の、処置、予防、診断または予後のための組成物を提供する。ここで、再生、診断、予防、処置または予後上有効な量は、当該分野において周知の技法を用いて当業者が種々のパラメータを参酌しながら決定することができ、そのような量を決定するためには、例えば、使用目的、対象疾患（種類、重篤度など）、患者の年齢、体重、性別、既往歴、細胞の形態または種類などを考慮して、当業者が容易に決定することができる（神経内科治療ガイド、小川紀雄著、中外医学社 1994を参照）。本発明では、神経の再生が、p75シグナル伝達経路を遮断することによって（Rhoポリペプチドに特異的に相互作用する（たとえば、阻害または抑制する）因子による）、神経突起伸展の阻害が破壊されることによることが明らかになった。このようなシグナル伝達経路の遮断による神経再生の効果は従来知られておらず、したがって、本発明は、従来技術より優れた効果を示す。

#### 【0723】

1つの実施形態において、この因子は、(a)配列番号11に記載の核酸配列のヌクレオチドもしくはそのフラグメントによってコードされる、ポリペプチド；(b)配列番号12に記載のアミノ酸配列のアミノ酸もしくはそのフラグメントを有する、ポリペプチド；(c)配列番号12に記載のアミノ酸配列のアミノ酸において、1以上のアミノ酸が、

置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも1つの変異を有する改変体ポリペプチドであって、生物学的活性を有する、改変体ポリペプチド；(d) 配列番号11に記載の塩基配列のヌクレオチドのスプライス改変体もしくは対立遺伝子改変体によってコードされる、ポリペプチド；(e) 配列番号12に記載のアミノ酸配列のアミノ酸を有するポリペプチドの、種相同体ポリペプチド；または(f) (a) ~ (e) のいずれか1つのポリペプチドのアミノ酸配列に対する同一性が少なくとも70%であるアミノ酸配列からなり、かつ、生物学的活性を有する、ポリペプチドに対して特異的に相互作用する、因子であり得る。

#### 【0724】

1つの好ましい実施形態において、上記(b)における置換、付加および欠失の数は限定されていてもよく、例えば、50以下、40以下、30以下、20以下、15以下、10以下、9以下、8以下、7以下、6以下、5以下、4以下、3以下、2以下であることが好ましい。より少ない数の置換、付加および欠失が好ましいが、生物学的活性を保持する(好ましくは、Rh<sub>o</sub>遺伝子産物と類似するかまたは実質的に同一の活性を有する)限り、多い数であってもよい。

#### 【0725】

好ましい実施形態において、本発明の因子は、核酸分子、ポリペプチド、脂質、糖鎖、有機低分子およびそれらの複合分子からなる群より選択される。

#### 【0726】

別の好ましい実施形態において、上記(c)における対立遺伝子変異体は、配列番号4に示すアミノ酸配列と少なくとも99%の相同性を有することが好ましい。

#### 【0727】

別の好ましい実施形態において、上記種相同体は、本明細書中上述のように同定することができ、配列番号12に示すアミノ酸配列と少なくとも約30%の相同性を有することが好ましい。好ましくは、種相同体は、上記基準配列と、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約98%、相同であり得る。

#### 【0728】

別の好ましい実施形態において、上記(e)における上記改変体ポリペプチドが有する生物学的活性としては、例えば、配列番号12に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドまたはそのフラグメントに対して特異的な抗体との相互作用、p75との相互作用などが挙げられるがそれらに限定されない。

#### 【0729】

好ましい実施形態において、上記(a) ~ (d) のいずれか1つのポリペプチドに対する相同性は、少なくとも約80%であり得、より好ましくは少なくとも約90%であり得、さらに好ましくは少なくとも約98%であり得、もっとも好ましくは少なくとも約99%であり得る。

#### 【0730】

本発明の因子が特異的に相互作用するポリペプチドは、通常、少なくとも3の連続するアミノ酸配列を有する。本発明のポリペプチドが有するアミノ酸長は、目的とする用途に適合する限り、どれだけ短くてもよいが、好ましくは、より長い配列が使用され得る。従って、好ましくは、少なくとも4アミノ酸長、より好ましくは少なくとも5アミノ酸長、少なくとも6アミノ酸長、少なくとも7アミノ酸長、少なくとも8アミノ酸長、少なくとも9アミノ酸長、少なくとも10アミノ酸長であってもよい。さらに好ましくは少なくとも15アミノ酸長であり得、なお好ましくは少なくとも20アミノ酸長であり得る。これらのアミノ酸長の下限は、具体的に挙げた数字のほかに、それらの間の数(例えば、11、12、13、14、16など)あるいは、それ以上の数(例えば、21、22、...、30、など)であってもよい。本発明の因子が特異的に相互作用するポリペプチドは、ある因子と相互作用することができる限り、その上限の長さは、配列番号12に示す配列の全長と同一であってもよく、それを超える長さであってもよい。

## 【0731】

好ましい実施形態において、本発明の因子は、核酸分子、ポリペプチド、脂質、糖鎖、有機低分子およびそれらの複合分子からなる群より選択される。より好ましくは、本発明の因子は、抗体またはその誘導体（例えば、単鎖抗体）である。従って、本発明の因子は、プローブおよび／またはインヒビターとして使用することができる。

## 【0732】

1つの実施形態において、R h oポリペプチド、またはそのフラグメントもしくは改変体は、配列番号12のアミノ酸配列の1位～193位を含む。より好ましくは、R h oポリペプチド、またはそのフラグメントもしくは改変体は、配列番号12のアミノ酸の全配列からなる。

## 【0733】

1つの実施形態において、処置されるべき神経の疾患、障害または状態は、本明細書において他の場所において記載されており、例えば、アルツハイマー病、脊髄損傷、脳血管障害、脳外傷などを含む。好ましくは、本発明の組成物が対象とする神経の疾患、障害または状態は、アルツハイマー病であり得る。他に好ましい実施形態では、本発明の組成物が対象とする神経の疾患、障害または状態は、脊髄損傷、脳血管障害、脳外傷であり得る。

## 【0734】

(R h oポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子)

1つの局面において、本発明は、R h oポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子を含む神経を再生するための組成物、およびR h oポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子を含む神経疾患、神経障害または神経の状態の、処置、予防、診断または予後のための組成物を提供する。ここで、再生、診断、予防、処置または予後上有効な量は、当該分野において周知の技法を用いて当業者が種々のパラメータを参酌しながら決定することができ、そのような量を決定するためには、例えば、使用目的、対象疾患（種類、重篤度など）、患者の年齢、体重、性別、既往歴、細胞の形態または種類などを考慮して、当業者が容易に決定することができる（神経内科治療ガイド、小川紀雄著、中外医学社 1994を参照）。本発明では、神経の再生が、p75シグナル伝達経路を遮断することによって（R h oポリペプチドに特異的に相互作用する因子による）、神経突起伸展の阻害が破壊されることによることが明らかになった。このようなシグナル伝達経路の遮断による神経再生の効果は従来知られておらず、したがって、本発明は、従来技術より優れた効果を示す。

## 【0735】

1つの実施形態において、この因子は、(a) 配列番号11に記載の塩基配列またはそのフラグメント配列を有するポリヌクレオチド；(b) 配列番号12に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドまたはそのフラグメントをコードするポリヌクレオチド；(c) 配列番号12に記載のアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が、置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも1つの変異を有する改変体ポリペプチドであって、生物学的活性を有する改変体ポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチド；(d) 配列番号11に記載の塩基配列のスプライス変異体または対立遺伝子変異体である、ポリヌクレオチド；(e) 配列番号12に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドの種相同体をコードする、ポリヌクレオチド；(f) (a)～(e)のいずれか1つのポリヌクレオチドにストリンジェント条件下でハイブリダイズし、かつ生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；または(g) (a)～(e)のいずれか1つのポリヌクレオチドまたはその相補配列に対する同一性が少なくとも70%である塩基配列からなり、かつ、生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、と特異的に相互作用する、因子であり得る。

## 【0736】

1つの好ましい実施形態において、上記(c)における置換、付加および欠失の数は、限定され、例えば、50以下、40以下、30以下、20以下、15以下、10以下、9

以下、8以下、7以下、6以下、5以下、4以下、3以下、2以下であることが好ましい。より少ない数の置換、付加および欠失が好ましいが、生物学的活性を保持する（好ましくは、Rho遺伝子産物と類似するかまたは実質的に同一の活性を有する）限り、多い数であってもよい。

#### 【0737】

別の好ましい実施形態において、上記改変体ポリペプチドが有する生物学的活性としては、例えば、配列番号12に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドまたはそのフラグメントに対して特異的な抗体との相互作用、p75との相互作用、p75またはRho GDIによるRhoの機能調節の調節などが挙げられるがそれらに限定されない。これらは例えば、免疫学的アッセイ、リン酸化定量などによって測定することができる。

#### 【0738】

別の好ましい実施形態において、対立遺伝子変異体は、配列番号11に示す核酸配列と少なくとも99%の相同性を有することが有利である。

#### 【0739】

上記種相同体は、その種の遺伝子配列データベースが存在する場合、そのデータベースに対して、本発明のRhoをクエリ配列として検索することによって同定することができる。あるいは、本発明のRhoの全部または一部をプローブまたはプライマーとして、その種の遺伝子ライブラリーをスクリーニングすることによって同定することができる。そのような同定方法は、当該分野において周知であり、本明細書において記載される文献にも記載されている。種相同体は、例えば、配列番号11に示す核酸配列と少なくとも約30%の相同性を有することが好ましい。好ましくは、種相同体は、上記基準配列と、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約98%、相同であり得る。

#### 【0740】

好ましい実施形態において、上記(a)～(e)のいずれか1つのポリヌクレオチドまたはその相補配列に対する同一性は、少なくとも約80%であり得、より好ましくは少なくとも約90%であり得、さらに好ましくは少なくとも約98%であり得、もっとも好ましくは少なくとも約99%であり得る。

#### 【0741】

好ましい実施形態において、本発明のRhoをコードする核酸分子またはそのフラグメントおよび改変体は、少なくとも8の連続するヌクレオチド長であり得る。本発明の核酸分子は、本発明の使用目的によってその適切なヌクレオチド長が変動し得る。より好ましくは、本発明の核酸分子は、少なくとも10の連続するヌクレオチド長であり得、さらに好ましくは少なくとも15の連続するヌクレオチド長であり得、なお好ましくは少なくとも20の連続するヌクレオチド長であり得る。これらのヌクレオチド長の下限は、具体的に挙げた数字のほかに、それらの間の数（例えば、9、11、12、13、14、16など）あるいは、それ以上の数（例えば、21、22、... 30、など）であってもよい。本発明の核酸分子は、目的とする用途（例えば、アンチセンス、RNAi、マーカー、プライマー、プローブ、所定の因子と相互作用し得ること）として使用することができる限り、その上限の長さは、配列番号11に示す配列の全長であってもよく、それを超える長さであってもよい。あるいは、プライマーとして使用する場合は、通常少なくとも約8のヌクレオチド長であり得、好ましくは約10ヌクレオチド長であり得る。プローブとして使用する場合は、通常少なくとも約15ヌクレオチド長であり得、好ましくは約17ヌクレオチド長であり得る。

#### 【0742】

1つの実施形態において、Rhoポリペプチドをコードする核酸分子、またはそのフラグメントもしくは改変体は、配列番号11の核酸配列の1位～579位を含む。より好ましくは、Rhoポリペプチドをコードする核酸分子、またはそのフラグメントもしくは改変体は、配列番号11の核酸配列の全範囲からなる。

## 【0743】

1つの実施形態において、処置されるべき神経の疾患、障害または状態は、本明細書において他の場所において記載されており、例えば、アルツハイマー病、脊髄損傷、脳血管障害、脳外傷などを含む。好ましくは、本発明の組成物が対象とする神経の疾患、障害または状態は、アルツハイマー病であり得る。他に好ましい実施形態では、本発明の組成物が対象とする神経の疾患、障害または状態は、脊髄損傷、脳血管障害、脳外傷であり得る。

## 【0744】

好ましい実施形態において、本発明の因子は、核酸分子、ポリペプチド、脂質、糖鎖、有機低分子およびそれらの複合分子からなる群より選択される。

## 【0745】

好ましい実施形態では、本発明の因子は、核酸分子である。本発明の因子が核酸分子である場合、そのような核酸分子は、少なくとも8の連続するヌクレオチド長であり得る。本発明の核酸分子は、本発明の使用目的によってその適切なヌクレオチド長が変動し得る。より好ましくは、本発明の核酸分子は、少なくとも10の連続するヌクレオチド長であり得、さらに好ましくは少なくとも15の連続するヌクレオチド長であり得、なお好ましくは少なくとも20の連続するヌクレオチド長であり得る。これらのヌクレオチド長の下限は、具体的に挙げた数字のほかに、それらの間の数（例えば、9、11、12、13、14、16など）あるいは、それ以上の数（例えば、21、22、... 30、など）であってもよい。本発明の核酸分子は、目的とする用途（例えば、アンチセンス、RNAi、マーカー、プライマー、プローブ、所定の因子と相互作用し得ること）として使用することができる限り、その上限の長さは、配列番号11に示す配列の全長であってもよく、それを超える長さであってもよい。あるいは、プライマーとして使用する場合は、通常少なくとも約8のヌクレオチド長であり得、好ましくは約10ヌクレオチド長であり得る。プローブとして使用する場合は、通常少なくとも約15ヌクレオチド長であり得、好ましくは約17ヌクレオチド長であり得る。

## 【0746】

従って、1つの例示的な実施形態において、本発明の因子は、上記(a)～(g)のいずれかのポリヌクレオチドの核酸配列に対して相補的な配列またはそれに対して少なくとも70%の同一性を有する配列を有する核酸分子であり得る。

## 【0747】

別の例示的な実施形態において、本発明の因子は、(a)～(g)のいずれかのポリヌクレオチドの核酸配列に対してストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸分子であり得る。ストリンジェンシーは、高くても、中程度であっても、低くてもよく、程度は、当業者が適宜状況に応じて決定することができる。

## 【0748】

別の好ましい実施形態では、本発明の因子は、アンチセンスまたはRNAiである。RNAiは、siRNAであってもshRNAであってもよく、そのような例としては、たとえば、約20塩基前後（例えば、代表的には約21～23塩基長）またはそれ未満の長さの二本鎖RNAであって、好ましくは、5'-リン酸、3'-OHの構造を有しており、3'末端は約2塩基突出している。shRNAはまた、好ましくは、3'突出末端を有し得る。二本鎖部分の長さは特に限定されないが、好ましくは約10ヌクレオチド長以上、より好ましくは約20ヌクレオチド長以上であり得る。ここで、3'突出末端は、好ましくはDNAであり得、より好ましくは少なくとも2ヌクレオチド長以上のDNAであり得、さらに好ましくは2～4ヌクレオチド長のDNAであり得る。

## 【0749】

(Rhoキナーゼのポリペプチド形態に特異的な因子)

1つの局面において、本発明は、Rhoキナーゼポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子を含む神経を再生するための組成物、およびRhoキナーゼポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子を含む神経疾



患、神経障害または神経の状態の、処置、予防、診断または予後のための組成物を提供する。ここで、再生、診断、予防、処置または予後上有効な量は、当該分野において周知の技法を用いて当業者が種々のパラメータを参酌しながら決定することができ、そのような量を決定するためには、例えば、使用目的、対象疾患（種類、重篤度など）、患者の年齢、体重、性別、既往歴、細胞の形態または種類などを考慮して、当業者が容易に決定することができる（神経内科治療ガイド、小川紀雄著、中外医学社 1994を参照）。本発明では、神経の再生が、p75シグナル伝達経路を遮断することによって（Rhokinaseポリペプチドに特異的に相互作用する（たとえば、阻害または抑制する）因子による）、神経突起伸展の阻害が破壊されることによることが明らかになった。このようなシグナル伝達経路の遮断による神経再生の効果は従来知られておらず、したがって、本発明は、従来技術より優れた効果を示す。

#### 【0750】

1つの実施形態において、この因子は、（a）配列番号18に記載の核酸配列のヌクレオチドもしくはそのフラグメントによってコードされる、ポリペプチド；（b）配列番号19に記載のアミノ酸配列のアミノ酸もしくはそのフラグメントを有する、ポリペプチド；（c）配列番号19に記載のアミノ酸配列のアミノ酸において、1以上のアミノ酸が、置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも1つの変異を有する改変体ポリペプチドであって、生物学的活性を有する、改変体ポリペプチド；（d）配列番号18に記載の塩基配列のヌクレオチドのスプライス改変体もしくは対立遺伝子改変体によってコードされる、ポリペプチド；（e）配列番号19に記載のアミノ酸配列のアミノ酸を有するポリペプチドの、種相同体ポリペプチド；または（f）（a）～（e）のいずれか1つのポリペプチドのアミノ酸配列に対する同一性が少なくとも70%であるアミノ酸配列からなり、かつ、生物学的活性を有する、ポリペプチドに対して特異的に相互作用する、因子であり得る。

#### 【0751】

1つの好ましい実施形態において、上記（b）における置換、付加および欠失の数は限定されていてもよく、例えば、50以下、40以下、30以下、20以下、15以下、10以下、9以下、8以下、7以下、6以下、5以下、4以下、3以下、2以下であることが好ましい。より少ない数の置換、付加および欠失が好ましいが、生物学的活性を保持する（好ましくは、Rhokinase遺伝子産物と類似するかまたは実質的に同一の活性を有する）限り、多い数であってもよい。

#### 【0752】

好ましい実施形態において、本発明の因子は、核酸分子、ポリペプチド、脂質、糖鎖、有機低分子およびそれらの複合分子からなる群より選択される。

#### 【0753】

別の好ましい実施形態において、上記（c）における対立遺伝子変異体は、配列番号4に示すアミノ酸配列と少なくとも99%の相同性を有することが好ましい。

#### 【0754】

別の好ましい実施形態において、上記種相同体は、本明細書中上述のように同定することができ、配列番号19に示すアミノ酸配列と少なくとも約30%の相同性を有することが好ましい。好ましくは、種相同体は、上記基準配列と、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約98%、相同であり得る。

#### 【0755】

別の好ましい実施形態において、上記（e）における上記改変体ポリペプチドが有する生物学的活性としては、例えば、配列番号19に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドまたはそのフラグメントに対して特異的な抗体との相互作用、p75との相互作用などが挙げられるがそれらに限定されない。

#### 【0756】

好ましい実施形態において、上記（a）～（d）のいずれか1つのポリペプチドに対す

る相同性は、少なくとも約80%であり得、より好ましくは少なくとも約90%であり得、さらに好ましくは少なくとも約98%であり得、もっとも好ましくは少なくとも約99%であり得る。

#### 【0757】

本発明の因子が特異的に相互作用するポリペプチドは、通常、少なくとも3の連続するアミノ酸配列を有する。本発明のポリペプチドが有するアミノ酸長は、目的とする用途に適合する限り、どれだけ短くてもよいが、好ましくは、より長い配列が使用され得る。従って、好ましくは、少なくとも4アミノ酸長、より好ましくは少なくとも5アミノ酸長、少なくとも6アミノ酸長、少なくとも7アミノ酸長、少なくとも8アミノ酸長、少なくとも9アミノ酸長、少なくとも10アミノ酸長であってもよい。さらに好ましくは少なくとも15アミノ酸長であり得、なお好ましくは少なくとも20アミノ酸長であり得る。これらのアミノ酸長の下限は、具体的に挙げた数字のほかに、それらの間の数（例えば、11、12、13、14、16など）あるいは、それ以上の数（例えば、21、22、...、30、など）であってもよい。本発明の因子が特異的に相互作用するポリペプチドは、ある因子と相互作用することができる限り、その上限の長さは、配列番号19に示す配列の全長と同一であってもよく、それを超える長さであってもよい。

#### 【0758】

好ましい実施形態において、本発明の因子は、核酸分子、ポリペプチド、脂質、糖鎖、有機低分子およびそれらの複合分子からなる群より選択される。より好ましくは、本発明の因子は、抗体またはその誘導体（例えば、単鎖抗体）である。従って、本発明の因子は、プローブおよび/またはインヒビターとして使用することができる。

#### 【0759】

1つの実施形態において、Rhoキナーゼポリペプチド、またはそのフラグメントもしくは改変体は、配列番号19のアミノ酸配列の1位～1388位を含む。より好ましくは、Rhoキナーゼポリペプチド、またはそのフラグメントもしくは改変体は、配列番号19のアミノ酸の全範囲からなる。

#### 【0760】

1つの実施形態において、処置されるべき神経の疾患、障害または状態は、本明細書において他の場所において記載されており、例えば、アルツハイマー病、脊髄損傷、脳血管障害、脳外傷などを含む。好ましくは、本発明の組成物が対象とする神経の疾患、障害または状態は、アルツハイマー病であり得る。他に好ましい実施形態では、本発明の組成物が対象とする神経の疾患、障害または状態は、脊髄損傷、脳血管障害、脳外傷であり得る。

#### 【0761】

(Rhoキナーゼポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子)

1つの局面において、本発明は、Rhoキナーゼポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子を含む神経を再生するための組成物、およびRhoキナーゼポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子を含む神経疾患、神経障害または神経の状態の、処置、予防、診断または予後のための組成物を提供する。ここで、再生、診断、予防、処置または予後上有効な量は、当該分野において周知の技法を用いて当業者が種々のパラメータを参酌しながら決定することができ、そのような量を決定するためには、例えば、使用目的、対象疾患（種類、重篤度など）、患者の年齢、体重、性別、既往歴、細胞の形態または種類などを考慮して、当業者が容易に決定することができる（神経内科治療ガイド、小川紀雄著、中外医学社 1994を参照）。本発明では、神経の再生が、p75シグナル伝達経路を遮断することによって（Rhoキナーゼポリペプチドに特異的に相互作用する因子による）、神経突起伸展の阻害が破壊されることによることが明らかになった。このようなシグナル伝達経路の遮断による神経再生の効果は従来知られておらず、したがって、本発明は、従来技術より優れた効果を示す。

#### 【0762】

1つの実施形態において、この因子は、(a) 配列番号18に記載の塩基配列またはそのフラグメント配列を有するポリヌクレオチド；(b) 配列番号19に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドまたはそのフラグメントをコードするポリヌクレオチド；(c) 配列番号19に記載のアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が、置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも1つの変異を有する改変体ポリペプチドであって、生物学的活性を有する改変体ポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチド；(d) 配列番号18に記載の塩基配列のスプライス変異体または対立遺伝子変異体である、ポリヌクレオチド；(e) 配列番号19に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドの種相同体をコードする、ポリヌクレオチド；(f) (a) ~ (e) のいずれか1つのポリヌクレオチドにストリンジェント条件下でハイブリダイズし、かつ生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；または (g) (a) ~ (e) のいずれか1つのポリヌクレオチドまたはその相補配列に対する同一性が少なくとも70%である塩基配列からなり、かつ、生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、と特異的に相互作用する、因子であり得る。

**【0763】**

1つの好ましい実施形態において、上記(c)における置換、付加および欠失の数は、限定され、例えば、50以下、40以下、30以下、20以下、15以下、10以下、9以下、8以下、7以下、6以下、5以下、4以下、3以下、2以下であることが好ましい。より少ない数の置換、付加および欠失が好ましいが、生物学的活性を保持する（好ましくは、Rhoキナーゼ遺伝子産物と類似するかまたは実質的に同一の活性を有する）限り、多い数であってもよい。

**【0764】**

別の好ましい実施形態において、上記改変体ポリペプチドが有する生物学的活性としては、例えば、配列番号19に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドまたはそのフラグメントに対して特異的な抗体との相互作用、p75との相互作用、p75またはRhoキナーゼ GDIによるRhoキナーゼの機能調節の調節などが挙げられるがそれらに限定されない。これらは例えば、免疫学的アッセイ、リン酸化定量などによって測定することができる。

**【0765】**

別の好ましい実施形態において、対立遺伝子変異体は、配列番号18に示す核酸配列と少なくとも99%の相同性を有することが有利である。

**【0766】**

上記種相同体は、その種の遺伝子配列データベースが存在する場合、そのデータベースに対して、本発明のRhoキナーゼをクエリ配列として検索することによって同定することができる。あるいは、本発明のRhoキナーゼの全部または一部をプローブまたはプライマーとして、その種の遺伝子ライブラリーをスクリーニングすることによって同定することができる。そのような同定方法は、当該分野において周知であり、本明細書において記載される文献にも記載されている。種相同体は、例えば、配列番号18に示す核酸配列と少なくとも約30%の相同性を有することが好ましい。好ましくは、種相同体は、上記基準配列と、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約98%、相同であり得る。

**【0767】**

好ましい実施形態において、上記(a) ~ (e) のいずれか1つのポリヌクレオチドまたはその相補配列に対する同一性は、少なくとも約80%であり得、より好ましくは少なくとも約90%であり得、さらに好ましくは少なくとも約98%であり得、もっとも好ましくは少なくとも約99%であり得る。

**【0768】**

好ましい実施形態において、本発明のRhoキナーゼをコードする核酸分子またはそのフラグメントおよび改変体は、少なくとも8の連続するヌクレオチド長であり得る。本発

明の核酸分子は、本発明の使用目的によってその適切なヌクレオチド長が変動し得る。より好ましくは、本発明の核酸分子は、少なくとも10の連続するヌクレオチド長であり得、さらに好ましくは少なくとも15の連続するヌクレオチド長であり得、なお好ましくは少なくとも20の連続するヌクレオチド長であり得る。これらのヌクレオチド長の下限は、具体的に挙げた数字のほかに、それらの間の数（例えば、9、11、12、13、14、16など）あるいは、それ以上の数（例えば、21、22、... 30、など）であってもよい。本発明の核酸分子は、目的とする用途（例えば、アンチセンス、RNAi、マーカー、プライマー、プローブ、所定の因子と相互作用し得ること）として使用することができる限り、その上限の長さは、配列番号18に示す配列の全長であってもよく、それを超える長さであってもよい。あるいは、プライマーとして使用する場合は、通常少なくとも約8のヌクレオチド長であり得、好ましくは約10ヌクレオチド長であり得る。プローブとして使用する場合は、通常少なくとも約15ヌクレオチド長であり得、好ましくは約17ヌクレオチド長であり得る。

#### 【0769】

1つの実施形態において、Rhoキナーゼポリペプチドをコードする核酸分子、またはそのフラグメントもしくは改変体は、配列番号18の核酸配列の1位～4164位を含む。より好ましくは、Rhoキナーゼポリペプチドをコードする核酸分子、またはそのフラグメントもしくは改変体は、配列番号18の核酸配列の全範囲からなる。

#### 【0770】

1つの実施形態において、処置されるべき神経の疾患、障害または状態は、本明細書において他の場所において記載されており、例えば、アルツハイマー病、脊髄損傷、脳血管障害、脳外傷などを含む。好ましくは、本発明の組成物が対象とする神経の疾患、障害または状態は、アルツハイマー病であり得る。他に好ましい実施形態では、本発明の組成物が対象とする神経の疾患、障害または状態は、脊髄損傷、脳血管障害、脳外傷であり得る。

#### 【0771】

好ましい実施形態において、本発明の因子は、核酸分子、ポリペプチド、脂質、糖鎖、有機低分子およびそれらの複合分子からなる群より選択される。

#### 【0772】

好ましい実施形態では、本発明の因子は、核酸分子である。本発明の因子が核酸分子である場合、そのような核酸分子は、少なくとも8の連続するヌクレオチド長であり得る。本発明の核酸分子は、本発明の使用目的によってその適切なヌクレオチド長が変動し得る。より好ましくは、本発明の核酸分子は、少なくとも10の連続するヌクレオチド長であり得、さらに好ましくは少なくとも15の連続するヌクレオチド長であり得、なお好ましくは少なくとも20の連続するヌクレオチド長であり得る。これらのヌクレオチド長の下限は、具体的に挙げた数字のほかに、それらの間の数（例えば、9、11、12、13、14、16など）あるいは、それ以上の数（例えば、21、22、... 30、など）であってもよい。本発明の核酸分子は、目的とする用途（例えば、アンチセンス、RNAi、マーカー、プライマー、プローブ、所定の因子と相互作用し得ること）として使用することができる限り、その上限の長さは、配列番号18に示す配列の全長であってもよく、それを超える長さであってもよい。あるいは、プライマーとして使用する場合は、通常少なくとも約8のヌクレオチド長であり得、好ましくは約10ヌクレオチド長であり得る。プローブとして使用する場合は、通常少なくとも約15ヌクレオチド長であり得、好ましくは約17ヌクレオチド長であり得る。

#### 【0773】

従って、1つの例示的な実施形態において、本発明の因子は、上記(a)～(g)のいずれかのポリヌクレオチドの核酸配列に対して相補的な配列またはそれに対して少なくとも70%の同一性を有する配列を有する核酸分子であり得る。

#### 【0774】

別の例示的な実施形態において、本発明の因子は、(a)～(g)のいずれかのポリヌ

クレオチドの核酸配列に対してストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸分子であり得る。ストリンジェンシーは、高くても、中程度であっても、低くてもよく、程度は、当業者が適宜状況に応じて決定することができる。

**【0775】**

別の好ましい実施形態では、本発明の因子は、アンチセンスまたはRNAiである。RNAiは、siRNAであってもshRNAであってもよく、そのような例としては、たとえば、約20塩基前後（例えば、代表的には約21～23塩基長）またはそれ未満の長さの二本鎖RNAであって、好ましくは、5' -リン酸、3' -OHの構造を有しており、3' 末端は約2塩基突出している。shRNAはまた、好ましくは、3' 突出末端を有し得る。二本鎖部分の長さは特に限定されないが、好ましくは約10ヌクレオチド長以上、より好ましくは約20ヌクレオチド長以上であり得る。ここで、3' 突出末端は、好ましくはDNAであり得、より好ましくは少なくとも2ヌクレオチド長以上のDNAであり得、さらに好ましくは2～4ヌクレオチド長のDNAであり得る。

**【0776】**

(p21のポリペプチド形態)

1つの局面において、本発明は、p21ポリペプチドを含む神経を再生するための組成物、およびp21ポリペプチドを含む神経疾患、神経障害または神経の状態の、処置、予防、診断または予後のための組成物を提供する。ここで、再生、診断、予防、処置または予後上有効な量は、本明細書の開示に基づいて、当該分野において周知の技法を用いて当業者が種々のパラメータを参酌しながら決定することができ、そのような量を決定するためには、例えば、使用目的、対象疾患（種類、重篤度など）、患者の年齢、体重、性別、既往歴、細胞の形態または種類などを考慮して、当業者が容易に決定することができる（神経内科治療ガイド、小川紀雄著、中外医学社 1994を参照）。本発明では、神経の再生が、p75シグナル伝達経路を遮断することによって（p21による）、神経突起伸展の阻害が破壊されることによることが明らかになった。このようなシグナル伝達経路の遮断による神経再生の効果は従来知られておらず、したがって、本発明は、従来技術より優れた効果を示す。

**【0777】**

1つの実施形態において、本発明において用いられるp21、またはそのフラグメントもしくは改変体は、(a) 配列番号14または配列番号23に記載のアミノ酸配列またはそのフラグメントからなる、ポリペプチド；(b) 配列番号14または配列番号23に記載のアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも1つの変異を有し、かつ、生物学的活性を有する、ポリペプチド；(c) 配列番号13または配列番号22に記載の塩基配列のスプライス変異体または対立遺伝子変異体によってコードされる、ポリペプチド；(d) 配列番号14または配列番号23に記載のアミノ酸配列の種相同体である、ポリペプチド；または(e) (a)～(d)のいずれか1つのポリペプチドに対する相同性が少なくとも70%であるアミノ酸配列を有し、かつ、生物学的活性を有する、ポリペプチド、を含む。

**【0778】**

1つの好ましい実施形態において、上記(b)における置換、付加および欠失の数は限定されていてもよく、例えば、50以下、40以下、30以下、20以下、15以下、10以下、9以下、8以下、7以下、6以下、5以下、4以下、3以下、2以下であることが好ましい。より少ない数の置換、付加および欠失が好ましいが、生物学的活性を保持する（好ましくは、p21遺伝子産物と類似するかまたは実質的に同一の活性を有する）限り、多い数であってもよい。

**【0779】**

別の好ましい実施形態において、上記(c)における対立遺伝子変異体は、配列番号14または配列番号23に示すアミノ酸配列と少なくとも99%の相同性を有することが好ましい。

**【0780】**

別の好ましい実施形態において、上記種相同体は、本明細書中上述のように同定することができ、配列番号14または配列番号23に示すアミノ酸配列と少なくとも約30%の相同性を有することが好ましい。好ましくは、種相同体は、上記基準配列と、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約98%、相同であり得る。

#### 【0781】

別の好ましい実施形態において、上記(e)における上記改変体ポリペプチドが有する生物学的活性としては、例えば、配列番号14または配列番号23に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドまたはそのフラグメントに対して特異的な抗体との相互作用、Rho GTP、Rhoキナーゼとの相互作用などが挙げられるがそれらに限定されない。

#### 【0782】

好ましい実施形態において、上記(a)～(d)のいずれか1つのポリペプチドに対する相同性は、少なくとも約80%であり得、より好ましくは少なくとも約90%であり得、さらに好ましくは少なくとも約98%であり得、もっとも好ましくは少なくとも約99%であり得る。

#### 【0783】

本発明のポリペプチドは、通常、少なくとも3の連続するアミノ酸配列を有する。本発明のポリペプチドが有するアミノ酸長は、目的とする用途に適合する限り、どれだけ短くてもよいが、好ましくは、より長い配列が使用され得る。従って、好ましくは、少なくとも4アミノ酸長、より好ましくは少なくとも5アミノ酸長、少なくとも6アミノ酸長、少なくとも7アミノ酸長、少なくとも8アミノ酸長、少なくとも9アミノ酸長、少なくとも10アミノ酸長であってもよい。さらに好ましくは少なくとも15アミノ酸長であり得、なお好ましくは少なくとも20アミノ酸長であり得る。これらのアミノ酸長の下限は、具体的に挙げた数字のほかに、それらの間の数(例えば、11、12、13、14、16など)あるいは、それ以上の数(例えば、21、22、... 30、など)であってもよい。本発明のポリペプチドは、ある因子と相互作用することができる限り、その上限の長さは、配列番号14または配列番号23に示す配列の全長と同一であってもよく、それを超える長さであってもよい。

#### 【0784】

1つの実施形態において、p21ポリペプチド、またはそのフラグメントもしくは改変体は、配列番号14または配列番号23のアミノ酸に示す1位～140位、または1位～164位を含む。より好ましくは、p21、またはそのフラグメントもしくは改変体は、配列番号14または配列番号23のアミノ酸1位～140位、または全範囲からなることが有利であり得る。別の好ましい実施形態では、p21、またはそのフラグメントもしくは改変体は、配列番号14または配列番号23のアミノ酸1位～140位を含み、141位以降の配列を含まないこと(このものを $\Delta$ NLS p21という)が有利であり得る。 $\Delta$ NLSとは、核移行シグナルの略称であり、核移行シグナルを機能させないような変異を挿入することによって、p21またはそのフラグメントもしくは改変体が細胞質のとどまることができ、それによって、p75シグナル伝達機構を抑制または阻害することができ、本発明の効果がより有利に達成され得る。

#### 【0785】

好ましい実施形態において、本発明の組成物に含まれるp21ポリペプチドは、さらに、PTDドメインを含むことが有利であり得る。PTDドメインの代表的配列としては、YGRKKRRQRRR(配列番号20)およびその改変体が挙げられるがそれらに限定されない。PTDドメインは、その細胞質移行活性が発揮される限り、神経再生因子(例えば、p21ポリペプチド)とどのような位置関係に配置されてもよいが、好ましい実施形態において、PTDドメインは、p21ポリペプチドのN末端またはC末端に配置されることが有利であり得る。

#### 【0786】

1つの実施形態において、処置されるべき神経の疾患、障害または状態は、本明細書において他の場所において記載されており、例えば、アルツハイマー病、脊髄損傷、脳血管障害、脳外傷などを含む。好ましくは、本発明の組成物が対象とする神経の疾患、障害または状態は、アルツハイマー病であり得る。他に好ましい実施形態では、本発明の組成物が対象とする神経の疾患、障害または状態は、脊髄損傷、脳血管障害、脳外傷であり得る。

#### 【0787】

(p 21の核酸形態)

1つの局面において、本発明は、P 21ポリペプチドをコードする核酸分子を含む神経を再生するための組成物、およびP 21ポリペプチドをコードする核酸分子を含む神経疾患、神経障害または神経の状態の、処置、予防、診断または予後のための組成物を提供する。ここで、再生、診断、予防、処置または予後上有効な量は、当該分野において周知の技法を用いて当業者が種々のパラメータを参酌しながら決定することができ、そのような量を決定するためには、例えば、使用目的、対象疾患（種類、重篤度など）、患者の年齢、体重、性別、既往歴、細胞の形態または種類などを考慮して、当業者が容易に決定することができる（神経内科治療ガイド、小川紀雄著、中外医学社 1994を参照）。本発明では、神経の再生が、p 75シグナル伝達経路を遮断することによって（P 21による）、神経突起伸展の障害が破壊されることによることが明らかになった。このようなシグナル伝達経路の遮断による神経再生の効果は従来知られておらず、したがって、本発明は、従来技術より優れた効果を示す。

#### 【0788】

1つの実施形態において、本発明において用いられるP 21をコードする核酸分子、またはそのフラグメントもしくは改変体は、（a）配列番号13または配列番号22に記載の塩基配列またはそのフラグメント配列を有するポリヌクレオチド；（b）配列番号14または配列番号23に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドまたはそのフラグメントをコードするポリヌクレオチド；（c）配列番号14または配列番号23に記載のアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が、置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも1つの変異を有する改変体ポリペプチドであって、生物学的活性を有する改変体ポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチド；（d）配列番号13または配列番号22に記載の塩基配列のスプライス変異体または対立遺伝子変異体である、ポリヌクレオチド；（e）配列番号14または配列番号23に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドの種相同体をコードする、ポリヌクレオチド；（f）（a）～（e）のいずれか1つのポリヌクレオチドにストリンジェント条件下でハイブリダイズし、かつ生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；または（g）（a）～（e）のいずれか1つのポリヌクレオチドまたはその相補配列に対する同一性が少なくとも70%である塩基配列からなり、かつ、生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、を含む。

#### 【0789】

1つの好ましい実施形態において、上記（c）における置換、付加および欠失の数は、限定され、例えば、50以下、40以下、30以下、20以下、15以下、10以下、9以下、8以下、7以下、6以下、5以下、4以下、3以下、2以下であることが好ましい。より少ない数の置換、付加および欠失が好ましいが、生物学的活性を保持する（好ましくは、P 21遺伝子産物と類似するかまたは実質的に同一の活性を有する）限り、多い数であってもよい。

#### 【0790】

別の好ましい実施形態において、上記改変体ポリペプチドが有する生物学的活性としては、例えば、配列番号14または配列番号23に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドまたはそのフラグメントに対して特異的な抗体との相互作用、Rhoキナーゼとの相互作用、Rho GTPの機能調節の調節などが挙げられるがそれらに限定されない。これらは例えば、免疫学的アッセイ、リン酸化定量などによって測定することができる。

## 【0791】

別の好ましい実施形態において、対立遺伝子変異体は、配列番号13または配列番号22に示す核酸配列と少なくとも99%の相同性を有することが有利である。

## 【0792】

上記種相同体は、その種の遺伝子配列データベースが存在する場合、そのデータベースに対して、本発明のP21をクエリ配列として検索することによって同定することができる。あるいは、本発明のP21の全部または一部をプローブまたはプライマーとして、その種の遺伝子ライブラリーをスクリーニングすることによって同定することができる。そのような同定方法は、当該分野において周知であり、本明細書において記載される文献にも記載されている。種相同体は、例えば、配列番号13または配列番号22に示す核酸配列と少なくとも約30%の相同性を有することが好ましい。好ましくは、種相同体は、上記基準配列と、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約98%、相同であり得る。

## 【0793】

好ましい実施形態において、上記(a)～(e)のいずれか1つのポリヌクレオチドまたはその相補配列に対する同一性は、少なくとも約80%であり得、より好ましくは少なくとも約90%であり得、さらに好ましくは少なくとも約98%であり得、もっとも好ましくは少なくとも約99%であり得る。

## 【0794】

好ましい実施形態において、本発明のP21をコードする核酸分子またはそのフラグメントおよび改変体は、少なくとも8の連続するヌクレオチド長であり得る。本発明の核酸分子は、本発明の使用目的によってその適切なヌクレオチド長が変動し得る。より好ましくは、本発明の核酸分子は、少なくとも10の連続するヌクレオチド長であり得、さらに好ましくは少なくとも15の連続するヌクレオチド長であり得、なお好ましくは少なくとも20の連続するヌクレオチド長であり得る。これらのヌクレオチド長の下限は、具体的に挙げた数字のほかに、それらの間の数（例えば、9、11、12、13、14、16など）あるいは、それ以上の数（例えば、21、22、... 30、など）であってもよい。本発明の核酸分子は、目的とする用途（例えば、アンチセンス、RNAi、マーカー、プライマー、プローブ、所定の因子と相互作用し得ること）として使用することができる限り、その上限の長さは、配列番号13または配列番号22に示す配列の全長であってもよく、それを超える長さであってもよい。あるいは、プライマーとして使用する場合は、通常少なくとも約8のヌクレオチド長であり得、好ましくは約10ヌクレオチド長であり得る。プローブとして使用する場合は、通常少なくとも約15ヌクレオチド長であり得、好ましくは約17ヌクレオチド長であり得る。

## 【0795】

1つの実施形態において、P21をコードする核酸分子、またはそのフラグメントもしくは改変体は、配列番号13または配列番号22の核酸配列の1位～420位または1位～492位を含む。より好ましくは、P21をコードする核酸分子、またはそのフラグメントもしくは改変体は、配列番号13または配列番号22の核酸配列の1位から420位または全範囲からなる。

## 【0796】

1つの実施形態において、p21ポリペプチド、またはそのフラグメントもしくは改変体は、配列番号13または配列番号22のヌクレオチド1位～420位または1位～492位を含む。より好ましくは、p21、またはそのフラグメントもしくは改変体は、配列番号13または配列番号22のヌクレオチド1位～420位または1位～492位、全範囲からなることが有利であり得る。別の好ましい実施形態では、p21、またはそのフラグメントもしくは改変体は、配列番号13または配列番号22のヌクレオチド1位～420位を含み、421位以降を含まないことが有利であり得る（本明細書においてこの形態をΔNLS p21ともいう）。ΔNLSとは、核移行シグナルの略称であり、核移行シ



グナルを機能させないような変異を挿入することによって、p 21 またはそのフラグメントもしくは改変体が細胞質のとどまることができ、それによって、p 75 シグナル伝達機構を抑制または阻害することができ、本発明の効果がより有利に達成され得る。

#### 【0797】

好ましい実施形態において、本発明の組成物に含まれる p 21 ポリペプチドをコードする核酸は、さらに、PTDドメインをコードする核酸配列を含むことが有利であり得る。PTDドメインの代表的配列としては、YGRKKRRQRRR（配列番号20）をコードする任意の核酸およびその改変体が挙げられるがそれに限定されない。PTDドメインをコードする核酸配列は、その細胞質移行活性が発揮される限り、神経再生因子（例えば、p 21 ポリペプチド）をコードする核酸配列とどのような位置関係に配置されてもよいが、好ましい実施形態において、PTDドメインをコードする核酸配列は、p 21 ポリペプチドをコードする核酸配列の3'末端または5'末端に配置されることが有利であり得る。

#### 【0798】

1つの実施形態において、処置されるべき神経の疾患、障害または状態は、本明細書において他の場所において記載されており、例えば、アルツハイマー病、脊髄損傷、脳血管障害、脳外傷などを含む。好ましくは、本発明の組成物が対象とする神経の疾患、障害または状態は、アルツハイマー病であり得る。他に好ましい実施形態では、本発明の組成物が対象とする神経の疾患、障害または状態は、脊髄損傷、脳血管障害、脳外傷であり得る。

#### 【0799】

（PKCのポリペプチド形態に特異的な因子）

1つの局面において、本発明は、PKCポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子を含む神経を再生するための組成物、およびPKCポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子を含む神経疾患、神経障害または神経の状態の、処置、予防、診断または予後のための組成物を提供する。ここで、再生、診断、予防、処置または予後上有効な量は、当該分野において周知の技法を用いて当業者が種々のパラメータを参酌しながら決定することができ、そのような量を決定するためには、例えば、使用目的、対象疾患（種類、重篤度など）、患者の年齢、体重、性別、既往歴、細胞の形態または種類などを考慮して、当業者が容易に決定することができる（神経内科治療ガイド、小川紀雄著、中外医学社 1994を参照）。本発明では、神経の再生が、p 75 シグナル伝達経路を遮断することによって（PKCポリペプチドに特異的に相互作用する（たとえば、阻害または抑制する）因子による）、神経突起伸展の阻害が破壊されることによることが明らかになった。このようなシグナル伝達経路の遮断による神経再生の効果は従来知られておらず、したがって、本発明は、従来技術より優れた効果を示す。

#### 【0800】

好ましい実施形態において、本発明において使用されるPKCは、PKC $\alpha$ であり得る。

#### 【0801】

1つの実施形態において、この因子は、（a）配列番号26に記載の核酸配列のヌクレオチドもしくはそのフラグメントによってコードされる、ポリペプチド；（b）配列番号27に記載のアミノ酸配列のアミノ酸もしくはそのフラグメントを有する、ポリペプチド；（c）配列番号27に記載のアミノ酸配列のアミノ酸において、1以上のアミノ酸が、置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも1つの変異を有する改変体ポリペプチドであって、生物学的活性を有する、改変体ポリペプチド；（d）配列番号26に記載の塩基配列のヌクレオチドのスプライス改変体もしくは対立遺伝子改変体によってコードされる、ポリペプチド；（e）配列番号27に記載のアミノ酸配列のアミノ酸を有するポリペプチドの、種相同体ポリペプチド；または（f）（a）～（e）のいずれか1つのポリペプチドのアミノ酸配列に対する同一性が少なくとも70%であるアミノ酸配列

からなり、かつ、生物学的活性を有する、ポリペプチドに対して特異的に相互作用する、因子であり得る。

**【0802】**

1つの好ましい実施形態において、上記(b)における置換、付加および欠失の数は限定されていてもよく、例えば、50以下、40以下、30以下、20以下、15以下、10以下、9以下、8以下、7以下、6以下、5以下、4以下、3以下、2以下であることが好ましい。より少ない数の置換、付加および欠失が好ましいが、生物学的活性を保持する(好ましくは、PKC遺伝子産物と類似するかまたは実質的に同一の活性を有する)限り、多い数であってもよい。

**【0803】**

好ましい実施形態において、本発明の因子は、核酸分子、ポリペプチド、脂質、糖鎖、有機低分子およびそれらの複合分子からなる群より選択される。

**【0804】**

別の好ましい実施形態において、上記(c)における対立遺伝子変異体は、配列番号4に示すアミノ酸配列と少なくとも99%の相同性を有することが好ましい。

**【0805】**

別の好ましい実施形態において、上記種相同体は、本明細書中上述のように同定することができ、配列番号27に示すアミノ酸配列と少なくとも約30%の相同性を有することが好ましい。好ましくは、種相同体は、上記基準配列と、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約98%、相同であり得る。

**【0806】**

別の好ましい実施形態において、上記(e)における上記改変体ポリペプチドが有する生物学的活性としては、例えば、配列番号27に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドまたはそのフラグメントに対して特異的な抗体との相互作用、p75との相互作用などが挙げられるがそれらに限定されない。

**【0807】**

好ましい実施形態において、上記(a)～(d)のいずれか1つのポリペプチドに対する相同性は、少なくとも約80%であり得、より好ましくは少なくとも約90%であり得、さらに好ましくは少なくとも約98%であり得、もっとも好ましくは少なくとも約99%であり得る。

**【0808】**

本発明の因子が特異的に相互作用するポリペプチドは、通常、少なくとも3の連続するアミノ酸配列を有する。本発明のポリペプチドが有するアミノ酸長は、目的とする用途に適合する限り、どれだけ短くてもよいが、好ましくは、より長い配列が使用され得る。従って、好ましくは、少なくとも4アミノ酸長、より好ましくは少なくとも5アミノ酸長、少なくとも6アミノ酸長、少なくとも7アミノ酸長、少なくとも8アミノ酸長、少なくとも9アミノ酸長、少なくとも10アミノ酸長であってもよい。さらに好ましくは少なくとも15アミノ酸長であり得、なお好ましくは少なくとも20アミノ酸長であり得る。これらのアミノ酸長の下限は、具体的に挙げた数字のほかに、それらの間の数(例えば、11、12、13、14、16など)あるいは、それ以上の数(例えば、21、22、...、30、など)であってもよい。本発明の因子が特異的に相互作用するポリペプチドは、ある因子と相互作用することができる限り、その上限の長さは、配列番号27に示す配列の全長と同一であってもよく、それを超える長さであってもよい。

**【0809】**

好ましい実施形態において、本発明の因子は、核酸分子、ポリペプチド、脂質、糖鎖、有機低分子およびそれらの複合分子からなる群より選択される。より好ましくは、本発明の因子は、抗体またはその誘導体(例えば、単鎖抗体)である。従って、本発明の因子は、プローブおよび/またはインヒビターとして使用することができる。

**【0810】**

1つの実施形態において、PKCポリペプチド、またはそのフラグメントもしくは改変体は、配列番号27のアミノ酸配列の1位~1388位を含む。より好ましくは、PKCポリペプチド、またはそのフラグメントもしくは改変体は、配列番号27のアミノ酸の全範囲からなる。

【0811】

別の好ましい実施形態において、PKCポリペプチドの阻害因子は、MAG、Nogoまたはp75あるいはその改変体またはフラグメントあるいはそれをコードする核酸分子であり得る。

【0812】

1つの実施形態において、処置されるべき神経の疾患、障害または状態は、本明細書において他の場所において記載されており、例えば、アルツハイマー病、脊髄損傷、脳血管障害、脳外傷などを含む。好ましくは、本発明の組成物が対象とする神経の疾患、障害または状態は、アルツハイマー病であり得る。他に好ましい実施形態では、本発明の組成物が対象とする神経の疾患、障害または状態は、脊髄損傷、脳血管障害、脳外傷であり得る。

【0813】

(PKCポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子)

1つの局面において、本発明は、PKCポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子を含む神経を再生するための組成物、およびPKCポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子を含む神経疾患、神経障害または神経の状態の、処置、予防、診断または予後のための組成物を提供する。ここで、再生、診断、予防、処置または予後上有効な量は、当該分野において周知の技法を用いて当業者が種々のパラメータを参酌しながら決定することができ、そのような量を決定するためには、例えば、使用目的、対象疾患（種類、重篤度など）、患者の年齢、体重、性別、既往歴、細胞の形態または種類などを考慮して、当業者が容易に決定することができる（神経内科治療ガイド、小川紀雄著、中外医学社 1994を参照）。本発明では、神経の再生が、p75シグナル伝達経路を遮断することによって（PKCポリペプチドに特異的に相互作用する因子による）、神経突起伸展の障害が破壊されることによることが明らかになった。このようなシグナル伝達経路の遮断による神経再生の効果は従来知られておらず、したがって、本発明は、従来技術より優れた効果を示す。

【0814】

好ましい実施形態において、本発明において使用されるPKCは、PKC $\alpha$ であり得る。

【0815】

1つの実施形態において、この因子は、(a) 配列番号26に記載の塩基配列またはそのフラグメント配列を有するポリヌクレオチド；(b) 配列番号27に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドまたはそのフラグメントをコードするポリヌクレオチド；(c) 配列番号27に記載のアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が、置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも1つの変異を有する改変体ポリペプチドであって、生物学的活性を有する改変体ポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチド；(d) 配列番号26に記載の塩基配列のスプライス変異体または対立遺伝子変異体である、ポリヌクレオチド；(e) 配列番号27に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドの種相同体をコードする、ポリヌクレオチド；(f) (a) ~ (e) のいずれか1つのポリヌクレオチドにストリンジェント条件下でハイブリダイズし、かつ生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；または(g) (a) ~ (e) のいずれか1つのポリヌクレオチドまたはその相補配列に対する同一性が少なくとも70%である塩基配列からなり、かつ、生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、と特異的に相互作用する、因子であり得る。

【0816】

1つの好ましい実施形態において、上記(c)における置換、付加および欠失の数は、

限定され、例えば、50以下、40以下、30以下、20以下、15以下、10以下、9以下、8以下、7以下、6以下、5以下、4以下、3以下、2以下であることが好ましい。より少ない数の置換、付加および欠失が好ましいが、生物学的活性を保持する（好ましくは、PKC遺伝子産物と類似するかまたは実質的に同一の活性を有する）限り、多い数であってもよい。

#### 【0817】

別の好ましい実施形態において、上記改変体ポリペプチドが有する生物学的活性としては、例えば、配列番号27に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドまたはそのフラグメントに対して特異的な抗体との相互作用、p75との直接または間接の相互作用、p75によるPKCの機能調節の調節などが挙げられるがそれらに限定されない。これらは例えば、免疫学的アッセイ、リン酸化定量などによって測定することができる。

#### 【0818】

別の好ましい実施形態において、対立遺伝子変異体は、配列番号26に示す核酸配列と少なくとも99%の相同性を有することが有利である。

#### 【0819】

上記種相同体は、その種の遺伝子配列データベースが存在する場合、そのデータベースに対して、本発明のPKCをクエリ配列として検索することによって同定することができる。あるいは、本発明のPKCの全部または一部をプローブまたはプライマーとして、その種の遺伝子ライブラリーをスクリーニングすることによって同定することができる。そのような同定方法は、当該分野において周知であり、本明細書において記載される文献にも記載されている。種相同体は、例えば、配列番号26に示す核酸配列と少なくとも約30%の相同性を有することが好ましい。好ましくは、種相同体は、上記基準配列と、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約98%、相同であり得る。

#### 【0820】

好ましい実施形態において、上記(a)～(e)のいずれか1つのポリヌクレオチドまたはその相補配列に対する同一性は、少なくとも約80%であり得、より好ましくは少なくとも約90%であり得、さらに好ましくは少なくとも約98%であり得、もっとも好ましくは少なくとも約99%であり得る。

#### 【0821】

好ましい実施形態において、本発明のPKCをコードする核酸分子またはそのフラグメントおよび改変体は、少なくとも8の連続するヌクレオチド長であり得る。本発明の核酸分子は、本発明の使用目的によってその適切なヌクレオチド長が変動し得る。より好ましくは、本発明の核酸分子は、少なくとも10の連続するヌクレオチド長であり得、さらに好ましくは少なくとも15の連続するヌクレオチド長であり得、なお好ましくは少なくとも20の連続するヌクレオチド長であり得る。これらのヌクレオチド長の下限は、具体的に挙げた数字のほかに、それらの間の数（例えば、9、11、12、13、14、16など）あるいは、それ以上の数（例えば、21、22、... 30、など）であってもよい。本発明の核酸分子は、目的とする用途（例えば、アンチセンス、RNAi、マーカー、プライマー、プローブ、所定の因子と相互作用し得ること）として使用することができる限り、その上限の長さは、配列番号26に示す配列の全長であってもよく、それを超える長さであってもよい。あるいは、プライマーとして使用する場合は、通常少なくとも約8のヌクレオチド長であり得、好ましくは約10ヌクレオチド長であり得る。プローブとして使用する場合は、通常少なくとも約15ヌクレオチド長であり得、好ましくは約17ヌクレオチド長であり得る。

#### 【0822】

1つの実施形態において、PKCポリペプチドをコードする核酸分子、またはそのフラグメントもしくは改変体は、配列番号26の核酸配列の1位～4164位を含む。より好ましくは、PKCポリペプチドをコードする核酸分子、またはそのフラグメントもしくは

改変体は、配列番号 26 の核酸配列の全範囲からなる。

【0823】

1つの実施形態において、処置されるべき神経の疾患、障害または状態は、本明細書において他の場所において記載されており、例えば、アルツハイマー病、脊髄損傷、脳血管障害、脳外傷などを含む。好ましくは、本発明の組成物が対象とする神経の疾患、障害または状態は、アルツハイマー病であり得る。他に好ましい実施形態では、本発明の組成物が対象とする神経の疾患、障害または状態は、脊髄損傷、脳血管障害、脳外傷であり得る。

【0824】

好ましい実施形態において、本発明の因子は、核酸分子、ポリペプチド、脂質、糖鎖、有機低分子およびそれらの複合分子からなる群より選択される。

【0825】

好ましい実施形態では、本発明の因子は、核酸分子である。本発明の因子が核酸分子である場合、そのような核酸分子は、少なくとも 8 の連続するヌクレオチド長であり得る。本発明の核酸分子は、本発明の使用目的によってその適切なヌクレオチド長が変動し得る。より好ましくは、本発明の核酸分子は、少なくとも 10 の連続するヌクレオチド長であり得、さらに好ましくは少なくとも 15 の連続するヌクレオチド長であり得、なお好ましくは少なくとも 20 の連続するヌクレオチド長であり得る。これらのヌクレオチド長の下限は、具体的に挙げた数字のほかに、それらの間の数（例えば、9、11、12、13、14、16 など）あるいは、それ以上の数（例えば、21、22、... 30、など）であってもよい。本発明の核酸分子は、目的とする用途（例えば、アンチセンス、RNAi、マーカー、プライマー、プローブ、所定の因子と相互作用し得ること）として使用することができる限り、その上限の長さは、配列番号 26 に示す配列の全長であってもよく、それを超える長さであってもよい。あるいは、プライマーとして使用する場合は、通常少なくとも約 8 のヌクレオチド長であり得、好ましくは約 10 ヌクレオチド長であり得る。プローブとして使用する場合は、通常少なくとも約 15 ヌクレオチド長であり得、好ましくは約 17 ヌクレオチド長であり得る。

【0826】

従って、1つの例示的な実施形態において、本発明の因子は、上記（a）～（g）のいずれかのポリヌクレオチドの核酸配列に対して相補的な配列またはそれに対して少なくとも 70 % の同一性を有する配列を有する核酸分子であり得る。

【0827】

別の例示的な実施形態において、本発明の因子は、（a）～（g）のいずれかのポリヌクレオチドの核酸配列に対してストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸分子であり得る。ストリンジェンシーは、高くても、中程度であっても、低くてもよく、程度は、当業者が適宜状況に応じて決定することができる。

【0828】

別の好ましい実施形態では、本発明の因子は、アンチセンスまたは RNAi である。RNAi は、siRNA であっても shRNA であってもよく、そのような例としては、たとえば、約 20 塩基前後（例えば、代表的には約 21～23 塩基長）またはそれ未満の長さの二本鎖 RNA であって、好ましくは、5' -リン酸、3' -OH の構造を有しており、3' 末端は約 2 塩基突出している。shRNA はまた、好ましくは、3' 突出末端を有し得る。二本鎖部分の長さは特に限定されないが、好ましくは約 10 ヌクレオチド長以上、より好ましくは約 20 ヌクレオチド長以上であり得る。ここで、3' 突出末端は、好ましくは DNA であり得、より好ましくは少なくとも 2 ヌクレオチド長以上の DNA であり得、さらに好ましくは 2～4 ヌクレオチド長の DNA であり得る。

【0829】

（IP<sub>3</sub> を調節する因子）

1つの局面において、本発明は、IP<sub>3</sub> を調節する因子を含む、神経再生を調節するための組成物および方法を提供する。本発明はまた、IP<sub>3</sub> を調節する因子を含む神経疾患

、神経障害または神経の状態の、処置、予防、診断または予後のための組成物を提供する。ここで、再生、診断、予防、処置または予後上有効な量は、当該分野において周知の技法を用いて当業者が種々のパラメータを参酌しながら決定することができ、そのような量を決定するためには、例えば、使用目的、対象疾患（種類、重篤度など）、患者の年齢、体重、性別、既往歴、細胞の形態または種類などを考慮して、当業者が容易に決定することができる（神経内科治療ガイド、小川紀雄著、中外医学社 1994を参照）。本発明では、神経の再生が、p75シグナル伝達経路を遮断することによって（PKCポリペプチドに特異的に相互作用する因子による）、神経突起伸展の障害が破壊されることによることが明らかになった。このようなシグナル伝達経路の遮断による神経再生の効果は従来知られておらず、したがって、本発明は、従来技術より優れた効果を示す。

#### 【0830】

別の好ましい実施形態において、IP<sub>3</sub>の活性化因子は、MAG、Nogoまたはp75あるいはその改変体またはフラグメントあるいはそれをコードする核酸分子であり得る。

#### 【0831】

IP<sub>3</sub>を調節する因子の別の例としては、例えば、IP<sub>3</sub>がGiにより調節されることから、Giまたはそれを調節する因子が挙げられるがそれらに限定されない。

#### 【0832】

IP<sub>3</sub>を調節（例えば、阻害または増強）する因子の同定は、当該分野において周知の技法を用いてスクリーニングすることができる。そのようなスクリーニングによって得られた因子もまた、本発明の範囲内にある。そのようなスクリーニングの方法としては、例えば、カルシウムの細胞内濃度変化をアッセイする方法が挙げられるがそれらに限定されない。このようなカルシウム細胞内濃度の変化は、当該分野において周知の技法を用いて測定することができる。

#### 【0833】

別の好ましい実施形態において、上記因子が有する生物学的活性としては、例えば、IP<sub>3</sub>の状態の調節などが挙げられるがそれらに限定されない。これらは例えば、免疫学的アッセイ、リン酸化定量などによって測定することができる。

#### 【0834】

1つの実施形態において、処置されるべき神経の疾患、障害または状態は、本明細書において他の場所において記載されており、例えば、アルツハイマー病、脊髄損傷、脳血管障害、脳外傷などを含む。好ましくは、本発明の組成物が対象とする神経の疾患、障害または状態は、アルツハイマー病であり得る。他に好ましい実施形態では、本発明の組成物が対象とする神経の疾患、障害または状態は、脊髄損傷、脳血管障害、脳外傷であり得る。

#### 【0835】

好ましい実施形態において、本発明の因子は、核酸分子、ポリペプチド、脂質、糖鎖、有機低分子およびそれらの複合分子からなる群より選択される。

#### 【0836】

（PTDドメインの神経再生への作用）

別の局面において、本発明は、TAT PTDドメインおよび神経再生因子を含む、神経を再生するための組成物を提供する。ここで、TAT PTDドメインは、代表的に、YGRKKRRQRRR（配列番号20）で示されるアミノ酸配列またはその改変体（例えば、1または数個のアミノ酸の置換、付加および／または欠失）が挙げられるがそれらに限定されない。本発明の組成物において使用される神経再生因子は、Pep5ポリペプチド、Pep5ポリペプチドをコードする核酸分子、p75ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、p75ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、p75細胞外ドメインポリペプチド、p75細胞外ドメインポリペプチドをコードする核酸分子、Rho GDIポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、Rho GDIポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、R

h o G D I ポリペプチド、R h o G D I ポリペプチドをコードする核酸分子、M A G ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、M A G ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、p 2 1 ポリペプチド、p 2 1 をコードする核酸分子、R h o ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、R h o ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、R h o キナーゼに対して特異的に相互作用する因子および R h o キナーゼをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子ならびにその改変体およびフラグメントから選択され得るがそれに限定されない。

#### 【0837】

したがって、別の局面において、本発明は、神経突起伸展の阻害を破壊するための組成物を提供する。

#### 【0838】

(P T D ドメインの神経再生医薬または補助剤としての利用)

別の局面において、本発明は、P T D ドメインおよび神経再生因子を含む、神経を再生するための組成物を提供する。P T D ドメインは、タンパク質の細胞内導入を促す作用を有し、細胞内に導入することが困難な分子の細胞内への導入に用いられているが、神経再生に用いられたことはなかった。したがって、本発明はまた、P T D ドメインの新規用途（すなわち、神経再生組成物の改良剤）を提供する。このような P T D は、代表的に、Y G R K K R R Q R R R（配列番号 20）で示されるアミノ酸配列またはその改変体もしくはフラグメントを含むが、それに限定されない。

#### 【0839】

本発明の P T D ドメインを用いる神経再生組成物において含有される神経再生因子は、どのようなものであってもよいが、好ましくは、p 7 5 シグナル伝達経路を阻害する因子であり得る。このような因子は、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、抗体、アンチセンス、R N A i などであってもよいが、それに限定されない。

#### 【0840】

別の好ましい実施形態において、本発明の P T D ドメインを用いる神経再生組成物において含有される神経再生因子は、p 7 5 シグナル伝達経路における伝達因子もしくはその改変体もしくはフラグメント、または p 7 5 シグナル伝達経路における伝達因子に対して特異的に相互作用する因子などであり得るがそれに限定されない。このような改変体およびフラグメントは好ましくは、もとの伝達因子と機能的に同等であるか少なくとも 1 つの機能を保持していることが有利である場合があるが、それに限定されず、所望により、機能を除去されていることが好ましくあり得る。

#### 【0841】

別の好ましい実施形態において、本発明の P T D ドメインを用いる神経再生組成物において p 7 5 シグナル伝達経路における伝達因子は、M A G、G T 1 b、p 7 5、R h o G D I、R h o、p 2 1 および R h o キナーゼからなる群より選択される少なくとも 1 つの伝達因子を含む。より好ましくは、細胞内において作用する因子であることが有利である。そのような細胞内で作用する因子としては、例えば、R h o G D I、R h o、R h o キナーゼが挙げられるがそれに限定されない。そのような R h o G D I、R h o、R h o キナーゼの阻害因子としては、例えば、p 2 1 またはその改変体もしくはフラグメント、P e p 5 またはその改変体もしくはフラグメントが挙げられるがそれらに限定されない。このような因子と P T D ドメインとを組み合わせることで、本発明において初めて見出された神経再生効果が顕著に増強されることが明らかになった。このような効果は、従来見出されておらず、驚くべき効果といえる。

#### 【0842】

別の好ましい実施形態において、本発明の P T D ドメインを用いる神経再生組成物において、神経再生因子は、M A G と G T 1 b との相互作用の阻害、G T 1 b と p 7 5 との相互作用の阻害、p 7 5 と R h o との相互作用の阻害、p 7 5 と R h o G D I との相互作用の阻害、R h o と R h o G D I との相互作用の維持または強化、R h o G D P から R

h o G T P への変換阻害、R h o と R h o キナーゼとの相互作用の阻害および R h o キナーゼの活性阻害からなる群より選択される少なくとも 1 つの作用を有し得る。このような作用は、関連する 2 つまたはそれを超える分子を調製し、それらと本発明の組成物とを接触させ、相互作用すべき分子の相互作用に変化があるかどうかを判定することによってみることができる。

#### 【0843】

別の好ましい実施形態において、本発明の P T D ドメインを用いる神経再生組成物において、神経再生因子は、M A G と G T 1 b との相互作用を抑制または消失する因子、G T 1 b と p 7 5 との相互作用を抑制または消失する因子、p 7 5 と R h o G D I との相互作用を抑制または消失する因子、p 7 5 と R h o との相互作用を抑制または消失する因子、R h o と R h o G D I との相互作用を維持または強化する因子、R h o G D P から R h o G T P への変換を阻害する因子、R h o と R h o キナーゼとの相互作用を阻害する因子、および R h o キナーゼの活性を阻害する因子からなる群より選択される少なくとも 1 つの因子を含み得る。このような因子は、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、低分子、抗体、RNA i、アンチセンスなどであり得るがそれらに限定されない。このような因子の詳細な説明は、本明細書の他の場所に記載されている。

#### 【0844】

別の好ましい実施形態において、本発明の P T D ドメインを用いる神経再生組成物において、神経再生因子は、P e p 5 ポリペプチド、P e p 5 ポリペプチドをコードする核酸分子、p 7 5 ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、p 7 5 ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、p 7 5 細胞外ドメインポリペプチド、p 7 5 細胞外ドメインポリペプチドをコードする核酸分子、R h o G D I ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、R h o G D I ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、R h o G D I ポリペプチド、R h o G D I ポリペプチドをコードする核酸分子、M A G ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、M A G ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、p 2 1 ポリペプチド、p 2 1 をコードする核酸分子、R h o ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、R h o ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、R h o キナーゼに対して特異的に相互作用する因子および R h o キナーゼをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子ならびにその改変体およびフラグメントからなる群より選択される因子を含み得る。このような因子は、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、低分子、抗体、RNA i、アンチセンスなどであり得るがそれらに限定されない。このような因子の詳細な説明は、本明細書の他の場所に記載されている。

#### 【0845】

別の好ましい実施形態において、P T D ドメインは、Y G R K K R R Q R R R またはその 1 または数個の置換、付加および／もしくは欠失を含むアミノ酸配列を有していてもよい。この場合、このような置換、付加および／もしくは欠失によって、細胞質への導入活性が失われていないことが好ましい。そのような導入活性は、このドメインを含むポリペプチドをコードする核酸分子で形質転換した細胞内で所望のポリペプチドがどこで発現されるかを判定することによって見出すことができる。

#### 【0846】

好ましい実施形態において、P T D ドメインは、前記神経再生因子の C 末端側、N 末端側などに配置されることが有利であり得る。このような場所に配置されることによって、神経再生因子の活性を損なうことなく、所望の活性（すなわち、細胞質内への導入）が行うことができるからである。したがって、好ましくは、本発明の P T D を用いた神経再生組成物において含有される神経再生因子は、細胞質に留まり得る。留まり得る時間としては、例えば、少なくとも数時間もしくは数日または数ヶ月に及び得るが、本発明では、神経再生の効果が発揮される限り、どのように短いまたは長い期間細胞質に留まり得る効果を有していても、そのような組成物を用いることができる。本明細書においてある因子が細胞質に留まり得るかどうかを判定する方法は、当該分野において周知の技術を用いて行



うことができ、たとえば、細胞の細胞質とその他の成分とに分離し（たとえば、細胞破壊の後遠心分離）細胞質に目的とする因子が存在するか否かを確認すること、あるいは、細胞を生きたまま観察し、目的とする因子に起因するシグナルを直接的または間接的（たとえば、抗体などを使用する）に視覚化または他の検知手段（たとえば、電気的検出手段）によって検出することによって達成され得る。

#### 【0847】

（PTDの核酸形態の神経再生医薬または補助剤としての利用）

別の局面において、本発明は、PTDドメインおよび神経再生因子であって核酸形態のものを含む、神経を再生するための組成物を提供する。したがって、本発明は、PTDドメインをコードする核酸配列および神経再生因子をコードする核酸配列を含む核酸分子を含む、神経を再生するための組成物を提供する。このような核酸分子は、上述したタンパク質分子同様、改善された神経再生効果を達成した。したがって、本発明のこの形態もまた、予想外の驚くべき効果を達成することができる。本発明はまた、PTDドメインをコードする核酸分子の新規用途（すなわち、神経再生組成物の改良剤）を提供する。このようなPTDは、代表的に、YGRKKRRQRRR（配列番号20）で示されるアミノ酸配列をコードする核酸配列またはその改変体もしくはフラグメントを含むが、それに限定されない。あるいは、そのような核酸分子は、HIV TATの核酸配列（配列番号21）に由来してもよい。

#### 【0848】

本発明のPTDドメインをコードする核酸配列を用いる神経再生組成物において含有される神経再生因子をコードする核酸配列は、どのようなものであってもよいが、好ましくは、p75シグナル伝達経路を阻害するものをコードすることが有利であり得る。

#### 【0849】

本発明のPTDドメインをコードする核酸配列を用いる神経再生組成物において含有される神経再生因子をコードする核酸配列は、p75シグナル伝達経路における伝達因子もしくはその改変体もしくはフラグメント、またはp75シグナル伝達経路における伝達因子に対して特異的に相互作用する因子をコードすることが好ましい。このような因子は、ポリペプチド、抗体などであり得るがそれらに限定されない。このような因子の詳細な説明は、本明細書の他の場所に記載されている。

#### 【0850】

本発明のPTDドメインをコードする核酸配列を用いる神経再生組成物において、標的とされるp75シグナル伝達経路における伝達因子は、MAG、GT1b、p75、RhogDI、Rhog、p21およびRhogキナーゼからなる群より選択される少なくとも1つの伝達因子を含み得る。p75シグナル伝達経路を阻害する因子とPTDドメインとを組み合わせることで、本発明において初めて見出された神経再生効果が顕著に増強されることが明らかになった。このような効果は、従来見出されておらず、驚くべき効果といえる。

#### 【0851】

本発明のPTDドメインをコードする核酸配列を用いる神経再生組成物において用いられる神経再生因子は、MAGとGT1bとの相互作用の阻害、GT1bとp75との相互作用の阻害、p75とRhogとの相互作用の阻害、p75とRhogDIとの相互作用の阻害、RhogとRhogDIとの相互作用の維持または強化、RhogGDPからRhogGTPへの変換阻害、RhogとRhogキナーゼとの相互作用の阻害およびRhogキナーゼの活性阻害からなる群より選択される少なくとも1つの作用を有し得る。このような作用は、関連する2つまたはそれを超える分子を調製し、それらと本発明の組成物に含まれるべき神経再生因子をコードする核酸分子を発現させたものとを接触させ、相互作用すべき分子の相互作用に変化があるかどうかを判定することによってみることができる。

#### 【0852】

本発明のPTDドメインをコードする核酸配列を用いる神経再生組成物において用いられる神経再生因子は、MAGとGT1bとの相互作用を抑制または消失する因子、GT1

bとp75との相互作用を抑制または消失する因子、p75とRho GDIとの相互作用を抑制または消失する因子、p75とRhoとの相互作用を抑制または消失する因子、RhoとRho GDIとの相互作用を維持または強化する因子、Rho GDPからRho GTPへの変換を阻害する因子、RhoとRhoキナーゼとの相互作用を阻害する因子、およびRhoキナーゼの活性を阻害する因子からなる群より選択される少なくとも1つの因子を含む。好ましくは、このような因子は、PTDと連結可能なポリペプチドであることが有利である。

#### 【0853】

本発明のPTDドメインをコードする核酸配列を用いる神経再生組成物において用いられる神経再生因子は、Pep5ポリペプチド、p75ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、p75ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、p75細胞外ドメインポリペプチド、Rho GDIポリペプチド、MAGポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、MAGポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、p21ポリペプチド、Rhoポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、Rhoポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、Rhoキナーゼに対して特異的に相互作用する因子およびRhoキナーゼをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子ならびにその改変体およびフラグメントからなる群より選択される因子を含む。好ましくは、このような因子は、PTDと連結可能なポリペプチドであることが有利である。

#### 【0854】

本発明のPTDドメインをコードする核酸配列を用いる神経再生組成物において、PTDドメインは、YGRKKRRQRRRまたはその1または数個の置換、付加および／もしくは欠失を含むアミノ酸配列を有する。

#### 【0855】

本発明のPTDドメインをコードする核酸配列を用いる神経再生組成物において、PTDドメインは、前記神経再生因子のC末端側、N末端側（すなわち、核酸配列の3'末端、5'末端）などに配置されることが有利であり得る。このような場所に配置されることによって、神経再生因子の活性を損なうことなく、所望の活性（すなわち、細胞質内への導入）が行うことができるからである。したがって、好ましくは、本発明のPTDを用いた神経再生組成物において含有される神経再生因子は、細胞質に留まり得る。留まり得る時間としては、例えば、少なくとも数時間もしくは数日または数ヶ月に及び得るが、本発明では、神経再生の効果が発揮される限り、どのように短いまたは長い期間細胞質に留まり得る効果を有していても、そのような組成物を用いることができる。

#### 【0856】

（PKCとIP<sub>3</sub>とのバランスを調節することによる神経再生の調節）

1つの局面において、本発明は、神経の再生を調節（例えば、増強、維持または抑制）する方法であって、p75シグナル伝達経路を調節する工程を含む、方法、および神経の再生を調節するための組成物であって、p75シグナル伝達経路を調節（例えば、増強、維持または抑制）する因子を含む、組成物を提供する。これらの再生方法を用いて、神経疾患、神経障害または神経の状態の、処置、予防、診断または予後のための組成物を提供する。ここで、再生、診断、予防、処置または予後上有効な量は、当該分野において周知の技法を用いて当業者が種々のパラメータを参酌しながら決定することができ、そのような量を決定するためには、例えば、使用目的、対象疾患（種類、重篤度など）、患者の年齢、体重、性別、既往歴、細胞の形態または種類などを考慮して、当業者が容易に決定することができる（神経内科治療ガイド、小川紀雄著、中外医学社 1994を参照）。

#### 【0857】

別の局面において、本発明は、神経障害および／または神経の状態を、処置、予防、診断または予後する方法であって、該処置、予防、診断または予後を必要とするかまたはそのことが予想される被検体において、p75シグナル伝達経路を調節する工程を含む、方法、ならびに神経疾患、神経障害および／または神経の状態を、処置、予防、診断または

予後するための組成物であって、p75シグナル伝達経路を調節する因子を含む、組成物を提供する。ここで、再生、診断、予防、処置または予後上有効な量は、当該分野において周知の技法を用いて当業者が種々のパラメータを参酌しながら決定することができ、そのような量を決定するためには、例えば、使用目的、対象疾患（種類、重篤度など）、患者の年齢、体重、性別、既往歴、細胞の形態または種類などを考慮して、当業者が容易に決定することができる（神経内科治療ガイド、小川紀雄著、中外医学社 1994を参照）。

#### 【0858】

1つの実施形態において、本発明は、PKCおよびIP<sub>3</sub>からなる群より選択される少なくとも1つの因子を調節する工程を包含することが好ましい。本発明では、p75シグナル伝達経路の状態が、予想外にPKCとIP<sub>3</sub>とのバランスを調節することによっても調節され得ることが判明したことにより、神経再生もまたPKCとIP<sub>3</sub>とのバランスを調節することを行うことによって調節され得ることを実証した（例えば、PKCポリペプチドに特異的に相互作用する因子、IP<sub>3</sub>調節因子により、例えば、神経突起伸展の阻害が破壊されることによることが明らかになった）。このようなシグナル伝達経路の遮断による神経再生の効果は従来知られておらず、したがって、本発明は、従来技術より優れた効果を示す。

#### 【0859】

より好ましくは、本発明は、PKCおよびIP<sub>3</sub>の両方の因子を調節する因子をさらに包含する。両方を調節することによって、より詳細な調節を行うことができ、バランス調節を行うことができるからである。

#### 【0860】

好ましい実施形態では、本発明は、PKCを阻害する工程を包含し得る。PKCを阻害することによって神経再生が促進されることが予想外に判明した。

#### 【0861】

別の好ましい実施形態では、本発明は、IP<sub>3</sub>を活性化する工程を包含することが好ましい。PKCを阻害することによって神経再生が促進されることが予想外に判明した。

#### 【0862】

ここで、上記p75シグナル伝達経路の調節は、MAG、PKC、IP<sub>3</sub>、GTPb、p75、Rho GDI、Rho、p21およびRhoキナーゼからなる群より選択される少なくとも1つの伝達因子の調節を含む。好ましくは、PKCおよびIP<sub>3</sub>と他の伝達因子との組み合わせを用いることが有利であり得るがそれに限定されない。

#### 【0863】

1つの好ましい実施形態では、p75シグナル伝達経路の調節は、RhoAの調節を含む。RhoAの調節がPKCとIP<sub>3</sub>とのバランスを調節することによって影響を受けることが判明したからである。

#### 【0864】

別の好ましい実施形態において、p75シグナル伝達経路の調節は、RhoAの活性化およびPKCの阻害を含み、前記再生の調節は再生の活性化である。あるいは、RhoAの活性化はIP<sub>3</sub>の活性化と組み合わせられ得る。さらに好ましくは、RhoAの活性化が、PKCの阻害およびIP<sub>3</sub>の活性化と組み合わせられ得る。このような組み合わせによって、神経再生が顕著に促進される。

#### 【0865】

好ましい実施形態において、PKCの調節因子は、MAG、Nogo、p75、PLCおよびGiからなる群より選択される。より好ましくは、PKCの調節因子は、MAG、Nogoまたはp75であり得る。

#### 【0866】

好ましい実施形態において、前記IP<sub>3</sub>の調節因子は、MAG、Nogo、p75、PLCおよびGiからなる群より選択される。より好ましくは、IP<sub>3</sub>の調節因子は、MAG、Nogoまたはp75であり得る。

**【0867】**

このようなPKCおよびIP<sub>3</sub>の調節因子は、既存のものを利用してよく、スクリーニングなどによって新規に合成したものを利用してもよい。

**【0868】**

別の実施形態において、本発明の神経の再生は、インビボまたはインビトロで行われる。

**【0869】**

1つの実施形態において、処置されるべき神経の疾患、障害または状態は、本明細書において他の場所において記載されており、例えば、アルツハイマー病、脊髄損傷、脳血管障害、脳外傷などを含む。好ましくは、本発明の組成物が対象とする神経の疾患、障害または状態は、アルツハイマー病であり得る。他に好ましい実施形態では、本発明の組成物が対象とする神経の疾患、障害または状態は、脊髄損傷、脳血管障害、脳外傷であり得る。

**【0870】**

好ましい実施形態において、本発明の因子は、核酸分子、ポリペプチド、脂質、糖鎖、有機低分子およびそれらの複合分子からなる群より選択される。

**【0871】**

このような因子は、PTDドメインに結合していてもよいがそれに限定されない。

**【0872】**

(神経再生法)

別の局面において、本発明は、神経を再生するための方法を提供する。この方法は、p75シグナル伝達経路を阻害する工程を含む。本発明では、p75シグナル伝達経路を阻害することによって神経が再生することが見出されたのは、従来の技術から予測されていなかったことであり、予想外の効果といえる。したがって、p75シグナル伝達経路を阻害することによる神経再生機構を用いて、種々の処置を行うことができ、そのような処置としては、神経疾患、障害または異常状態の処置、予防、診断、予後などが挙げられるがそれらに限定されない。

**【0873】**

好ましくは、p75シグナル伝達経路は、神経再生が所望される部位における神経細胞のものであり、対象となる神経細胞におけるp75シグナル伝達経路が阻害または抑制されることによって、神経遮断が減少または阻害（破壊）され、所望の場所において有利に神経再生を生じさせることができる。

**【0874】**

1つの実施形態において、p75シグナル伝達経路の阻害は、p75シグナル伝達経路における伝達因子もしくはその改変体もしくはフラグメント（好ましくは、このような改変体もしくはフラグメントはその伝達因子と同様の機能を有する）、またはp75シグナル伝達経路における伝達因子に対して特異的に相互作用する因子を再生に有効な量で提供することによって達成され得る。

**【0875】**

別の実施形態において、p75シグナル伝達経路における伝達因子は、MAG、PKC、IP<sub>3</sub>、GTLb、p75、Rho GDI、Rho、p21およびRhoキナーゼからなる群より選択される少なくとも1つの伝達因子を含むがそれに限定されない。このような伝達因子を阻害または抑制する方法としては、その伝達因子またはそれをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子を投与または提供する方法、その伝達因子の発現を減少、抑制または阻害する方法、その伝達因子の機能が阻害されるような変異を導入する方法などが挙げられるがそれらに限定されない。

**【0876】**

別の実施形態において、p75シグナル伝達経路の阻害は、MAGとGTLbとの相互作用の阻害、PKCの阻害、IP<sub>3</sub>の活性化、GTLbとp75との相互作用の阻害、p75とRhoとの相互作用の阻害、p75とRho GDIとの相互作用の阻害、Rho

と R h o G D I との相互作用の維持または強化、R h o G D P から R h o G T P への変換阻害、R h o と R h o キナーゼとの相互作用の阻害および R h o キナーゼの活性阻害からなる群より選択され得るがそれに限定されない。ここで、相互作用の阻害は、インヒビターを投与すること、特異的に相互作用する因子を提供することなどによって達成され得る。相互作用の維持または強化は、相互作用を弱める因子を排除すること、あるいは、関連する分子の量を増加させることなどによって達成され得るがそれらに限定されない。

【0877】

別の実施形態において、p 7 5 シグナル伝達経路の阻害は、M A G と G T 1 b との相互作用を抑制または消失する因子、P K C の阻害因子、I P <sub>3</sub> の活性化因子、G T 1 b と p 7 5 との相互作用を抑制または消失する因子、p 7 5 と R h o G D I との相互作用を抑制または消失する因子、p 7 5 と R h o との相互作用を抑制または消失する因子、R h o と R h o G D I との相互作用を維持または強化する因子、R h o G D P から R h o G T P への変換を阻害する因子、R h o と R h o キナーゼとの相互作用を阻害する因子、および R h o キナーゼの活性を阻害する因子からなる群より選択される少なくとも 1 つの因子を再生に有効な量で提供することによって達成され得る。

【0878】

本発明の神経再生法において、神経の再生は、インビボまたはインビトロで行われ得る。インビボで行われる場合は、体内で直接神経の治療または予防などが行われ得る。インビトロで行われる場合は、神経集団を調製することができる。

【0879】

1 つの実施形態において、神経は、脊髄損傷、脳血管障害または脳外傷を含む状態にある。あるいは、処置される神経は、本明細書において列挙される任意の神経疾患、神経障害または異常状態であり得る。そのような疾患、障害または状態としては、例えば、大脳損傷、脊髄損傷、発作、脱髄疾患（例えば、多発性硬化症）、単語症脱髄、脳脊髄炎、多病巣性白質脳症、汎脳炎、マルキアファーフアービニャーミ病、海綿状変性、アレグザンダー病、キャナヴァン病、異染性白質萎縮症およびクラッペ病が挙げられるがそれらに限定されない。

【0880】

別の実施形態において、本発明の神経再生法における p 7 5 シグナル伝達経路を阻害する工程は、再生に有効な量の、P e p 5 ポリペプチド、P e p 5 ポリペプチドをコードする核酸分子、P K C の阻害因子、I P <sub>3</sub> の活性化因子、p 7 5 ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、p 7 5 ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、p 7 5 細胞外ドメインポリペプチド、p 7 5 細胞外ドメインポリペプチドをコードする核酸分子、R h o G D I ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、R h o G D I ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、R h o G D I ポリペプチド、R h o G D I ポリペプチドをコードする核酸分子、M A G ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、M A G ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、p 2 1 ポリペプチド、p 2 1 をコードする核酸分子、R h o ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、R h o ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、R h o キナーゼに対して特異的に相互作用する因子および R h o キナーゼをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子ならびにその改変体およびフラグメントからなる群より選択される少なくとも 1 つの分子を含む組成物を、所望の神経に与える工程によって達成され得る。

【0881】

本発明の神経再生法において、神経再生を担う因子は、P T D ドメインに結合して提供され得る。

【0882】

本発明の神経再生法において、再生に有効な量は、当該分野において周知の技法を用いて当業者が種々のパラメータを参酌しながら決定することができ、そのような量を決定するためには、例えば、使用目的、対象疾患（種類、重篤度など）、患者の年齢、体重、性

別、既往歴、細胞の形態または種類などを考慮して、当業者が容易に決定することができる（神経内科治療ガイド、小川紀雄著、中外医学社 1994を参照）。本発明では、神経の再生が、p75シグナル伝達経路を遮断することによって（例えば、p75シグナル伝達経路の関連因子を介する）、神経突起伸展の障害が破壊されることによることが明らかになった。このようなシグナル伝達経路の遮断による神経再生の効果は従来知られておらず、したがって、本発明は、従来技術より優れた効果を示す。

#### 【0883】

1つの実施形態では、Pep5ポリペプチド、Pep5ポリペプチドをコードする核酸分子、PKCの阻害因子、IP<sub>3</sub>の活性化因子、p75ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、p75ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、p75細胞外ドメインポリペプチド、p75細胞外ドメインポリペプチドをコードする核酸分子、RhogDIポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、RhogDIポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、RhogDIポリペプチド、RhogDIポリペプチドをコードする核酸分子、MAGポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、MAGポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、p21ポリペプチド、p21をコードする核酸分子、Rhogポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、Rhogポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、Rhogキナーゼに対して特異的に相互作用する因子およびRhogキナーゼをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子ならびにその改変体およびフラグメントは、本明細書において上記に記載されるような形態をとることができる。本発明では、神経の再生が、p75シグナル伝達経路を遮断することによって、神経突起伸展の障害が破壊されることによることが明らかになった。このようなシグナル伝達経路の遮断による神経再生の効果は従来知られておらず、したがって、本発明は、従来技術より優れた効果を示す。特に、Pep5ポリペプチド、Pep5ポリペプチドをコードする核酸分子、p75ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、p75ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、p75細胞外ドメインポリペプチド、p75細胞外ドメインポリペプチドをコードする核酸分子、RhogDIポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、RhogDIポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、RhogDIポリペプチド、RhogDIポリペプチドをコードする核酸分子、MAGポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、MAGポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、p21ポリペプチド、p21をコードする核酸分子、Rhogポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、Rhogポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、Rhogキナーゼに対して特異的に相互作用する因子およびRhogキナーゼをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子ならびにその改変体およびフラグメントは、複数用いることが好ましくあり得る。そのような場合、種々の組み合わせが利用され得る。好ましくは、2つ、3つあるいは4つのポリペプチド、ポリヌクレオチドおよび／または因子を用いることができる。別の好ましい実施形態では、経路上の複数の分子が阻害されることが有利であり得る。

#### 【0884】

別の局面において、本発明はまた、神経を再生するための組成物を提供する。この組成物は、再生に有効な量のp75シグナル伝達経路を阻害する因子を含む。このような組成物は、本明細書に記載されるように、当該分野において周知の技術を用いて処方することができる。

#### 【0885】

1つの実施形態において、p75シグナル伝達経路を阻害する因子は、p75シグナル伝達経路における伝達因子もしくはその改変体もしくはフラグメント（好ましくは、このような改変体もしくはフラグメントはその伝達因子と同様の機能を有する）、またはp75シグナル伝達経路における伝達因子に対して特異的に相互作用する因子であり得、この因子は、本発明の組成物において、再生に有効な量で含有される。

## 【0886】

別の実施形態において、p75シグナル伝達経路における伝達因子は、MAG、PKC、IP<sub>3</sub>、GTPb、p75、Rho GDI、Rho、p21およびRhoキナーゼからなる群より選択される少なくとも1つの伝達因子を含むがそれに限定されない。

## 【0887】

別の実施形態において、p75シグナル伝達経路を阻害する因子は、MAGとGTPbとの相互作用の阻害、PKCの阻害、IP<sub>3</sub>の活性化、GTPbとp75との相互作用の阻害、p75とRhoとの相互作用の阻害、p75とRho GDIとの相互作用の阻害、RhoとRho GDIとの相互作用の維持または強化、RhoGDPからRhoGTPへの変換阻害、RhoとRhoキナーゼとの相互作用の阻害およびRhoキナーゼの活性阻害からなる群より選択される活性を有し得る。

## 【0888】

別の実施形態において、p75シグナル伝達経路を阻害する因子は、MAGとGTPbとの相互作用を抑制または消失する因子、PKCの阻害因子、IP<sub>3</sub>の活性化因子、GTPbとp75との相互作用を抑制または消失する因子、p75とRho GDIとの相互作用を抑制または消失する因子、p75とRhoとの相互作用を抑制または消失する因子、RhoとRho GDIとの相互作用を維持または強化する因子、RhoGDPからRhoGTPへの変換を阻害する因子、RhoとRhoキナーゼとの相互作用を阻害する因子、およびRhoキナーゼの活性を阻害する因子からなる群より選択される少なくとも1つの因子であり得る。このような因子は、再生に有効な量で含有され得る。

## 【0889】

別の実施形態において、p75シグナル伝達経路を阻害する因子は、再生に有効な量の、Pep5ポリペプチド、Pep5ポリペプチドをコードする核酸分子、PKCの阻害因子、IP<sub>3</sub>の活性化因子、p75ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、p75ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、p75細胞外ドメインポリペプチド、p75細胞外ドメインポリペプチドをコードする核酸分子、Rho GDIポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、Rho GDIポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、Rho GDIポリペプチドをコードする核酸分子、MAGポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、MAGポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、p21ポリペプチド、p21をコードする核酸分子、Rhoポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、Rhoポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、Rhoキナーゼに対して特異的に相互作用する因子およびRhoキナーゼをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子ならびにその改変体およびフラグメントからなる群より選択される少なくとも1つの分子を含む。ここで、再生に有効な量は、当該分野において周知の技法を用いて当業者が種々のパラメータを参酌しながら決定することができ、そのような量を決定するためには、例えば、使用目的、対象疾患（種類、重篤度など）、患者の年齢、体重、性別、既往歴、細胞の形態または種類などを考慮して、当業者が容易に決定することができる。

## 【0890】

別の実施形態において、p75シグナル伝達経路を阻害する因子は、診断、予防、処置または予後上有効な量の、診断、予防、処置または予後に有効な量の、Pep5ポリペプチド、Pep5ポリペプチドをコードする核酸分子、PKCの阻害因子、IP<sub>3</sub>の活性化因子、p75ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、p75ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、p75細胞外ドメインポリペプチド、p75細胞外ドメインポリペプチドをコードする核酸分子、Rho GDIポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、Rho GDIポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、Rho GDIポリペプチドをコードする核酸分子、MAGポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、MAGポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、p

21ポリペプチド、p21をコードする核酸分子、Rhoポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、Rhoポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、Rhoキナーゼに対して特異的に相互作用する因子およびRhoキナーゼをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子ならびにその改変体およびフラグメントからなる群より選択される少なくとも1つの分子を含む。ここで、診断、予防、処置または予後上有効な量は、当該分野において周知の技法を用いて当業者が種々のパラメータを参酌しながら決定することができ、そのような量を決定するためには、例えば、使用目的、対象疾患（種類、重篤度など）、患者の年齢、体重、性別、既往歴、細胞の形態または種類などを考慮して、当業者が容易に決定することができる。

#### 【0891】

別の好ましい実施形態では、本発明はまた、Pep5ポリペプチド、Pep5ポリペプチドをコードする核酸分子、PKCの阻害因子、IP<sub>3</sub>の活性化因子、p75ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、p75ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、p75細胞外ドメインポリペプチド、p75細胞外ドメインポリペプチドをコードする核酸分子、Rho GDIポリペプチド、Rho GDIポリペプチドをコードする核酸分子、MAGポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、MAGポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、p21ポリペプチド、p21をコードする核酸分子、Rhoポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、Rhoポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、Rhoキナーゼに対して特異的に相互作用する因子およびRhoキナーゼをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子ならびにその改変体およびフラグメントを、複数含み得る。この場合、種々の組み合わせが利用され得る。好ましくは、2つ、3つあるいは4つのポリペプチド、ポリヌクレオチドおよび／または因子を用いることができる。別の好ましい実施形態では、経路上の複数の分子を阻害する物質を使用することが有利であり得る。

#### 【0892】

本発明の組成物において使用される因子は、PTDドメインを含んでいてもよい。

#### 【0893】

本発明はまた、上述の組成物を備える、神経再生キットにも関する。このようなキットは、本発明の組成物のほか、投与方法を記載した指示書を備え得る。このような指示書は、本明細書の他の場所において記載されている。

#### 【0894】

本発明はまた、p75シグナル伝達経路を阻害する因子の、神経再生医薬の製造のための使用に関する。

#### 【0895】

（神経学的疾患、障害または状態の診断、予防、処置または予後）

別の局面において、本発明は、神経学的疾患、障害または状態の診断、予防、処置または予後のための方法を提供する。この方法は、p75シグナル伝達経路を阻害する工程を含む。本発明では、p75シグナル伝達経路を阻害することによって神経学的疾患、障害または状態の診断、予防、処置または予後に用いることができることが見出されたのは、従来の技術から予測されていなかったことであり、予想外の効果といえる。

#### 【0896】

好ましくは、p75シグナル伝達経路は、神経学的疾患、障害または状態の診断、予防、処置または予後が所望される部位における神経細胞のものであり、対象となる神経細胞におけるp75シグナル伝達経路が阻害または抑制されることによって、神経遮断が減少または阻害（破壊）され、所望の場所において有利に神経再生を生じさせることができる。

#### 【0897】

1つの実施形態において、p75シグナル伝達経路の阻害は、p75シグナル伝達経路における伝達因子もしくはその改変体もしくはフラグメント（好ましくは、このような改



変体もしくはフラグメントはその伝達因子と同様の機能を有する)、またはp75シグナル伝達経路における伝達因子に対して特異的に相互作用する因子を再生に有効な量で提供することによって達成され得る。

#### 【0898】

別の実施形態において、p75シグナル伝達経路における伝達因子は、MAG、PKC、IP<sub>3</sub>、GTPb、p75、Rho GDI、Rho、p21およびRhoキナーゼからなる群より選択される少なくとも1つの伝達因子を含むがそれに限定されない。このような伝達因子を阻害または抑制する方法としては、その伝達因子またはそれをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子を投与または提供する方法、その伝達因子の発現を減少、抑制または阻害する方法、その伝達因子の機能が阻害されるような変異を導入する方法などが挙げられるがそれらに限定されない。

#### 【0899】

別の実施形態において、p75シグナル伝達経路の阻害は、MAGとGTPbとの相互作用の阻害、PKCの阻害、IP<sub>3</sub>の活性化、GTPbとp75との相互作用の阻害、p75とRhoとの相互作用の阻害、p75とRho GDIとの相互作用の阻害、RhoとRho GDIとの相互作用の維持または強化、RhoGDPからRhoGTPへの変換阻害、RhoとRhoキナーゼとの相互作用の阻害およびRhoキナーゼの活性阻害からなる群より選択され得るがそれに限定されない。ここで、相互作用の阻害は、インヒビターを投与すること、特異的に相互作用する因子を提供することなどによって達成され得る。相互作用の維持または強化は、相互作用を弱める因子を排除すること、あるいは、関連する分子の量を増加させることなどによって達成され得るがそれらに限定されない。

#### 【0900】

別の実施形態において、p75シグナル伝達経路の阻害は、MAGとGTPbとの相互作用を抑制または消失する因子、PKCの阻害因子、IP<sub>3</sub>の活性化因子、GTPbとp75との相互作用を抑制または消失する因子、p75とRho GDIとの相互作用を抑制または消失する因子、p75とRhoとの相互作用を抑制または消失する因子、RhoとRho GDIとの相互作用を維持または強化する因子、RhoGDPからRhoGTPへの変換を阻害する因子、RhoとRhoキナーゼとの相互作用を阻害する因子、およびRhoキナーゼの活性を阻害する因子からなる群より選択される少なくとも1つの因子を再生に有効な量で提供することによって達成され得る。

#### 【0901】

本発明の神経学的疾患、障害または状態の診断、予防、処置または予後のための方法において、神経の再生は、インビボまたはエキソビボで行われ得る。インビボで行われる場合は、体内で直接神経の治療または予防などが行われ得る。エキソビボで行われる場合は、神経集団を調製し、その集団を患者または被検体ことができる。

#### 【0902】

1つの実施形態において、神経は、脊髄損傷、脳血管障害または脳外傷を含む状態にある。処置され得る神経疾患、障害または状態は、本明細書において列挙される任意の神経疾患、神経障害または異常状態であり得る。そのような疾患、障害または状態としては、例えば、大脳損傷、脊髄損傷、発作、脱髄疾患（例えば、多発性硬化症）、単語症脱髄、脳脊髄炎、多病巣性白質脳症、汎脳炎、マルキアファアーヴァービニャーミ病、海綿状変性、アレグザンダー病、キャナヴァン病、異染性白質萎縮症およびクラッペ病が挙げられるがそれらに限定されない。

#### 【0903】

別の実施形態において、神経学的疾患、障害または状態の診断、予防、処置または予後のための方法におけるp75シグナル伝達経路を阻害する工程は、再生に有効な量の、Pep5ポリペプチド、Pep5ポリペプチドをコードする核酸分子、PKCの阻害因子、IP<sub>3</sub>の活性化因子、p75ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、p75ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、p75細胞外ドメインポリペプチド、p75細胞外ドメインポリペプチドをコードする核酸分子、Rho

GDIポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、Rho GDIポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、Rho GDIポリペプチド、Rho GDIポリペプチドをコードする核酸分子、MAGポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、MAGポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、p21ポリペプチド、p21をコードする核酸分子、Rhoポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、Rhoポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、Rhoキナーゼに対して特異的に相互作用する因子およびRhoキナーゼをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子ならびにその改変体およびフラグメントからなる群より選択される少なくとも1つの分子を含む組成物を、所望の神経に与える工程によって達成され得る。

【0904】

本発明の神経学的疾患、障害または状態の診断、予防、処置または予後のための方法において、神経再生を担う因子は、PTDドメインに結合して提供され得る。

【0905】

1つの実施形態において、本発明の神経学的疾患、障害または状態の診断、予防、処置または予後のための方法は、再生に有効な量の、Pep5ポリペプチド、Pep5ポリペプチドをコードする核酸分子、PKCの阻害因子、IP<sub>3</sub>の活性化因子、p75ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、p75ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、p75細胞外ドメインポリペプチド、p75細胞外ドメインポリペプチドをコードする核酸分子、Rho GDIポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、Rho GDIポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、Rho GDIポリペプチド、Rho GDIポリペプチドをコードする核酸分子、MAGポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、MAGポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、p21ポリペプチド、p21をコードする核酸分子、Rhoポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、Rhoポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、Rhoキナーゼに対して特異的に相互作用する因子およびRhoキナーゼをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子ならびにその改変体およびフラグメントからなる群より選択される少なくとも1つの分子を含む組成物を該神経に与える工程、を包含する。ここで、再生に有効な量は、当該分野において周知の技法を用いて当業者が種々のパラメータを参酌しながら決定することができ、そのような量を決定するためには、例えば、使用目的、対象疾患（種類、重篤度など）、患者の年齢、体重、性別、既往歴、細胞の形態または種類などを考慮して、当業者が容易に決定することができる（神経内科治療ガイド、小川紀雄著、中外医学社 1994を参照）。本発明では、神経の再生が、p75シグナル伝達経路を遮断することによって（p75シグナル伝達経路の関連因子）、神経突起伸展の障害が破壊されることによることが明らかになった。このようなシグナル伝達経路の遮断による神経再生の効果は従来知られておらず、したがって、本発明は、従来技術より優れた効果を示す。

【0906】

1つの実施形態では、Pep5ポリペプチド、Pep5ポリペプチドをコードする核酸分子、PKCの阻害因子、IP<sub>3</sub>の活性化因子、p75ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、p75ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、p75細胞外ドメインポリペプチド、p75細胞外ドメインポリペプチドをコードする核酸分子、Rho GDIポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、Rho GDIポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、Rho GDIポリペプチド、Rho GDIポリペプチドをコードする核酸分子、MAGポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、MAGポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、p21ポリペプチド、p21をコードする核酸分子、Rhoポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、Rhoポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、Rhoキナーゼに対して特異的に相

相互作用する因子およびRhoキナーゼをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子ならびにその改変体およびフラグメントは、本明細書において上記に記載されるような形態をとることができる。本発明では、神経の再生が、p75シグナル伝達経路を遮断することによって、神経突起伸展の阻害が破壊されることによることが明らかになった。このようなシグナル伝達経路の遮断による神経再生の効果は従来知られておらず、したがって、本発明は、従来技術より優れた効果を示す。特に、p75ポリペプチド、p75ポリペプチドをコードする核酸分子、PKCの阻害因子、IP<sub>3</sub>の活性化因子、p75ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、p75ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、p75細胞外ドメインポリペプチド、p75細胞外ドメインポリペプチドをコードする核酸分子、Rho GDIポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、Rho GDIポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、Rho GDIポリペプチド、Rho GDIポリペプチドをコードする核酸分子、MAGポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、MAGポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、p21ポリペプチド、p21をコードする核酸分子、Rhoポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、Rhoポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、Rhoキナーゼに対して特異的に相互作用する因子およびRhoキナーゼをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子ならびにその改変体およびフラグメントは、複数用いることが好ましくあり得る。そのような場合、種々の組み合わせが利用され得る。好ましくは、2つ、3つあるいは4つのポリペプチド、ポリヌクレオチドおよび／または因子を用いることができる。別の好ましい実施形態では、経路上の複数の分子が阻害されることが有利であり得る。

#### 【0907】

別の局面において、神経学的疾患、障害または状態の診断、予防、処置または予後のための組成物を提供する。この組成物は、診断、予防、処置または予後に有効な量のp75シグナル伝達経路を阻害する因子を含む。このような組成物は、本明細書に記載されるように、当該分野において周知の技術を用いて処方することができる。

#### 【0908】

1つの実施形態において、p75シグナル伝達経路を阻害する因子は、p75シグナル伝達経路における伝達因子もしくはその改変体もしくはフラグメント（好ましくは、このような改変体もしくはフラグメントはその伝達因子と同様の機能を有する）、またはp75シグナル伝達経路における伝達因子に対して特異的に相互作用する因子であり得、この因子は、本発明の組成物において、再生に有効な量で含有される。

#### 【0909】

別の実施形態において、p75シグナル伝達経路における伝達因子は、MAG、PKC、IP<sub>3</sub>、GT1b、p75、Rho GDI、Rho、p21およびRhoキナーゼからなる群より選択される少なくとも1つの伝達因子を含むがそれ限定されない。

#### 【0910】

別の実施形態において、p75シグナル伝達経路を阻害する因子は、MAGとGT1bとの相互作用の阻害、PKCの阻害、IP<sub>3</sub>の活性化、GT1bとp75との相互作用の阻害、p75とRhoとの相互作用の阻害、p75とRho GDIとの相互作用の阻害、RhoとRho GDIとの相互作用の維持または強化、RhoGDPからRhoGTPへの変換阻害、RhoとRhoキナーゼとの相互作用の阻害およびRhoキナーゼの活性阻害からなる群より選択される活性を有し得る。

#### 【0911】

別の実施形態において、p75シグナル伝達経路を阻害する因子は、MAGとGT1bとの相互作用を抑制または消失する因子、PKCの阻害因子、IP<sub>3</sub>の活性化因子、GT1bとp75との相互作用を抑制または消失する因子、p75とRho GDIとの相互作用を抑制または消失する因子、p75とRhoとの相互作用を抑制または消失する因子、RhoとRho GDIとの相互作用を維持または強化する因子、RhoGDPからR

h o G T P への変換を阻害する因子、R h o と R h o キナーゼとの相互作用を阻害する因子、および R h o キナーゼの活性を阻害する因子からなる群より選択される少なくとも 1 つの因子であり得る。このような因子は、診断、予防、処置または予後に有効な量で含有され得る。

【0912】

別の実施形態において、p 7 5 シグナル伝達経路を阻害する因子は、診断、予防、処置または予後に有効な量の、P e p 5 ポリペプチド、P e p 5 ポリペプチドをコードする核酸分子、P K C の阻害因子、I P<sub>3</sub> の活性化因子、p 7 5 ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、p 7 5 ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、p 7 5 細胞外ドメインポリペプチド、p 7 5 細胞外ドメインポリペプチドをコードする核酸分子、R h o G D I ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、R h o G D I ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、R h o G D I ポリペプチド、R h o G D I ポリペプチドをコードする核酸分子、M A G ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、M A G ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、p 2 1 ポリペプチド、p 2 1 をコードする核酸分子、R h o ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、R h o ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、R h o キナーゼに対して特異的に相互作用する因子および R h o キナーゼをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子ならびにその改変体およびフラグメントからなる群より選択される少なくとも 1 つの分子を含む。ここで、診断、予防、処置または予後上有効な量は、当該分野において周知の技法を用いて当業者が種々のパラメータを参酌しながら決定することができ、そのような量を決定するためには、例えば、使用目的、対象疾患（種類、重篤度など）、患者の年齢、体重、性別、既往歴、細胞の形態または種類などを考慮して、当業者が容易に決定することができる。

【0913】

別の好ましい実施形態では、本発明はまた、P e p 5 ポリペプチド、P e p 5 ポリペプチドをコードする核酸分子、P K C の阻害因子、I P<sub>3</sub> の活性化因子、p 7 5 ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、p 7 5 ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、p 7 5 細胞外ドメインポリペプチド、p 7 5 細胞外ドメインポリペプチドをコードする核酸分子、R h o G D I ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、R h o G D I ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、R h o G D I ポリペプチド、R h o G D I ポリペプチドをコードする核酸分子、M A G ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、M A G ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、p 2 1 ポリペプチド、p 2 1 をコードする核酸分子、R h o ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、R h o ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、R h o キナーゼに対して特異的に相互作用する因子および R h o キナーゼをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子ならびにその改変体およびフラグメントを、複数含む、神経学的疾患、障害または状態の診断、予防、処置または予後のための組成物を提供する。この場合、種々の組み合わせが利用され得る。好ましくは、2 つ、3 つあるいは 4 つのポリペプチド、ポリヌクレオチドおよび／または因子を用いることができる。別の好ましい実施形態では、経路上の複数の分子を阻害する物質を使用することが有利であり得る。

【0914】

本発明の組成物において使用される因子は、P T D ドメインを含んでいてもよい。

【0915】

本発明はまた、上述の組成物を備える、神経学的疾患、障害または状態の診断、予防、処置または予後のためのキットにも関する。このようなキットは、本発明の組成物のほか、投与方法を記載した指示書を備え得る。このような指示書は、本明細書の他の場所において記載されている。

【0916】

本発明はまた、p 75 シグナル伝達経路を阻害する因子の、神経学的疾患、障害または状態の診断、予防、処置または予後のための医薬の製造のための使用に関する。

【0917】

(神経突起伸展の阻害を破壊または減少する方法)

別の局面において、本発明は、神経突起伸展の阻害を破壊または減少する方法を提供する。この方法は、p 75 シグナル伝達経路を阻害する工程を含む。本発明では、p 75 シグナル伝達経路を阻害することによって神経突起伸展の阻害を破壊または減少することができるが見出されたのは、従来の技術から予測されていなかったことであり、予想外の効果といえる。

【0918】

好ましくは、p 75 シグナル伝達経路は、神経突起伸展の阻害の破壊または減少が所望される部位における神経細胞のものであり、対象となる神経細胞におけるp 75 シグナル伝達経路が阻害または抑制されることによって、神経遮断が減少または阻害（破壊）され、所望の場所において有利に神経突起伸展の阻害の破壊または減少を生じさせることができる。

【0919】

1つの実施形態において、p 75 シグナル伝達経路の阻害は、p 75 シグナル伝達経路における伝達因子もしくはその改変体もしくはフラグメント（好ましくは、このような改変体もしくはフラグメントはその伝達因子と同様の機能を有する）、またはp 75 シグナル伝達経路における伝達因子に対して特異的に相互作用する因子を再生に有効な量で提供することによって達成され得る。

【0920】

別の実施形態において、p 75 シグナル伝達経路における伝達因子は、MAG、PKC、IP<sub>3</sub>、GTPb、p 75、Rho GDI、Rho、p 21およびRhoキナーゼからなる群より選択される少なくとも1つの伝達因子を含むがそれに限定されない。このような伝達因子を阻害または抑制する方法としては、その伝達因子またはそれをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子を投与または提供する方法、その伝達因子の発現を減少、抑制または阻害する方法、その伝達因子の機能が阻害されるような変異を導入する方法などが挙げられるがそれらに限定されない。

【0921】

別の実施形態において、p 75 シグナル伝達経路の阻害は、MAGとGTPbとの相互作用の阻害、PKCの阻害、IP<sub>3</sub>の活性化、GTPbとp 75との相互作用の阻害、p 75とRhoとの相互作用の阻害、p 75とRho GDIとの相互作用の阻害、RhoとRho GDIとの相互作用の維持または強化、RhoGDPからRhoGTPへの変換阻害、RhoとRhoキナーゼとの相互作用の阻害およびRhoキナーゼの活性阻害からなる群より選択され得るがそれに限定されない。ここで、相互作用の阻害は、インヒビターを投与すること、特異的に相互作用する因子を提供することなどによって達成され得る。相互作用の維持または強化は、相互作用を弱める因子を排除すること、あるいは、関連する分子の量を増加させることなどによって達成され得るがそれらに限定されない。

【0922】

別の実施形態において、p 75 シグナル伝達経路の阻害は、MAGとGTPbとの相互作用を抑制または消失する因子、PKCの阻害因子、IP<sub>3</sub>の活性化因子、GTPbとp 75との相互作用を抑制または消失する因子、p 75とRho GDIとの相互作用を抑制または消失する因子、p 75とRhoとの相互作用を抑制または消失する因子、RhoとRho GDIとの相互作用を維持または強化する因子、RhoGDPからRhoGTPへの変換を阻害する因子、RhoとRhoキナーゼとの相互作用を阻害する因子、およびRhoキナーゼの活性を阻害する因子からなる群より選択される少なくとも1つの因子を再生に有効な量で提供することによって達成され得る。

【0923】

本発明の神経突起伸展の阻害を破壊または減少する方法において、神経の再生は、イン

ビボまたはエキソビボで行われ得る。インビボで行われる場合は、体内で直接神経の治療または予防などが行われ得る。エキソビボで行われる場合は、神経集団を調製し、その集団を患者または被検体ことができる。

#### 【0924】

1つの実施形態において、神経は、脊髄損傷、脳血管障害または脳外傷を含む状態にある。処置され得る神経疾患、障害または状態は、本明細書において列举される任意の神経疾患、神経障害または異常状態であり得る。そのような疾患、障害または状態としては、例えば、大脳損傷、脊髄損傷、発作、脱髄疾患（例えば、多発性硬化症）、単語症脱髄、脳脊髄炎、多病巣性白質脳症、汎脳炎、マルキアファアーヴァービニャーミ病、海綿状変性、アレグザンダー病、キャナヴァン病、異染性白質萎縮症およびクラッペ病が挙げられるがそれらに限定されない。

#### 【0925】

別の実施形態において、神経突起伸展の阻害を破壊または減少する方法における p75 シグナル伝達経路を阻害する工程は、再生に有効な量の、Pep5 ポリペプチド、Pep5 ポリペプチドをコードする核酸分子、PKC の阻害因子、IP<sub>3</sub> の活性化因子、p75 ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、p75 ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、p75 細胞外ドメインポリペプチド、p75 細胞外ドメインポリペプチドをコードする核酸分子、RhogDI ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、RhogDI ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、RhogDI ポリペプチド、RhogDI ポリペプチドをコードする核酸分子、MAG ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、MAG ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、p21 ポリペプチド、p21 をコードする核酸分子、RhogDI ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、RhogDI ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、RhogDI キナーゼに対して特異的に相互作用する因子および RhogDI キナーゼをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子ならびにその改変体およびフラグメントからなる群より選択される少なくとも1つの分子を含む組成物を、所望の神経に与える工程によって達成され得る。

#### 【0926】

本発明の神経突起伸展の阻害を破壊または減少する方法において、神経再生を担う因子は、PTD ドメインに結合して提供され得る。

#### 【0927】

1つの実施形態において、本発明の神経突起伸展の阻害を破壊または減少する方法は、再生に有効な量の、Pep5 ポリペプチド、Pep5 ポリペプチドをコードする核酸分子、PKC の阻害因子、IP<sub>3</sub> の活性化因子、p75 ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、p75 ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、p75 細胞外ドメインポリペプチド、p75 細胞外ドメインポリペプチドをコードする核酸分子、RhogDI ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、RhogDI ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、RhogDI ポリペプチド、RhogDI ポリペプチドをコードする核酸分子、MAG ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、MAG ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、p21 ポリペプチド、p21 をコードする核酸分子、RhogDI ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、RhogDI ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、RhogDI キナーゼに対して特異的に相互作用する因子および RhogDI キナーゼをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子ならびにその改変体およびフラグメントからなる群より選択される少なくとも1つの分子を含む組成物を該神経に与える工程、を包含する。ここで、再生に有効な量は、当該分野において周知の技法を用いて当業者が種々のパラメータを参酌しながら決定することができ、そのような量を決定するためには、例えば、使用目的、対象疾患（種類、重篤度など）、患者の年齢、体重、性別、既往歴、細胞の形態または種類などを考慮して、当業者

が容易に決定することができる（神経内科治療ガイド、小川紀雄著、中外医学社 1994を参照）。本発明では、神経の再生が、p 75シグナル伝達経路を遮断することによって（p 75シグナル伝達経路の関連因子）、神経突起伸展の阻害が破壊されることによることが明らかになった。このようなシグナル伝達経路の遮断による神経再生の効果は従来知られておらず、したがって、本発明は、従来技術より優れた効果を示す。

#### 【0928】

1つの実施形態では、Pep5ポリペプチド、Pep5ポリペプチドをコードする核酸分子、PKCの阻害因子、IP<sub>3</sub>の活性化因子、p 75ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、p 75ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、p 75細胞外ドメインポリペプチド、p 75細胞外ドメインポリペプチドをコードする核酸分子、RhogDIポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、RhogDIポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、RhogDIポリペプチド、RhogDIポリペプチドをコードする核酸分子、MAGポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、MAGポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、p 21ポリペプチド、p 21をコードする核酸分子、Rhogポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、Rhogポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、Rhogキナーゼに対して特異的に相互作用する因子およびRhogキナーゼをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子ならびにその改変体およびフラグメントは、本明細書において上記に記載されるような形態をとることができる。本発明では、神経の再生が、p 75シグナル伝達経路を遮断することによって、神経突起伸展の阻害が破壊されることによることが明らかになった。このようなシグナル伝達経路の遮断による神経再生の効果は従来知られておらず、したがって、本発明は、従来技術より優れた効果を示す。特に、Pep5ポリペプチド、Pep5ポリペプチドをコードする核酸分子、PKCの阻害因子、IP<sub>3</sub>の活性化因子、p 75ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、p 75ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、p 75細胞外ドメインポリペプチド、p 75細胞外ドメインポリペプチドをコードする核酸分子、RhogDIポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、RhogDIポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、RhogDIポリペプチド、RhogDIポリペプチドをコードする核酸分子、MAGポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、MAGポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、p 21ポリペプチド、p 21をコードする核酸分子、Rhogポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、Rhogポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、Rhogキナーゼに対して特異的に相互作用する因子およびRhogキナーゼをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子ならびにその改変体およびフラグメントは、複数用いることが好ましくあり得る。そのような場合、種々の組み合わせが利用され得る。好ましくは、2つ、3つあるいは4つのポリペプチド、ポリヌクレオチドおよび／または因子を用いることができる。別の好ましい実施形態では、経路上の複数の分子が阻害されることが有利であり得る。

#### 【0929】

別の局面において、神経突起伸展の阻害を破壊または減少するための組成物を提供する。この組成物は、再生に有効な量のp 75シグナル伝達経路を阻害する因子を含む。このような組成物は、本明細書に記載されるように、当該分野において周知の技術を用いて処方することができる。

#### 【0930】

1つの実施形態において、p 75シグナル伝達経路を阻害する因子は、p 75シグナル伝達経路における伝達因子もしくはその改変体もしくはフラグメント（好ましくは、このような改変体もしくはフラグメントはその伝達因子と同様の機能を有する）、またはp 75シグナル伝達経路における伝達因子に対して特異的に相互作用する因子であり得、この因子は、本発明の組成物において、再生に有効な量で含有される。



## 【0931】

別の実施形態において、p75シグナル伝達経路における伝達因子は、MAG、PKC、IP<sub>3</sub>、G1b、p75、Rho GDI、Rho、p21およびRhoキナーゼからなる群より選択される少なくとも1つの伝達因子を含むがそれに限定されない。

## 【0932】

別の実施形態において、p75シグナル伝達経路を阻害する因子は、MAGとG1bとの相互作用の阻害、PKCの阻害、IP<sub>3</sub>の活性化、G1bとp75との相互作用の阻害、p75とRhoとの相互作用の阻害、p75とRho GDIとの相互作用の阻害、RhoとRho GDIとの相互作用の維持または強化、RhoGDPからRhoGTPへの変換阻害、RhoとRhoキナーゼとの相互作用の阻害およびRhoキナーゼの活性阻害からなる群より選択される活性を有し得る。

## 【0933】

別の実施形態において、p75シグナル伝達経路を阻害する因子は、MAGとG1bとの相互作用を抑制または消失する因子、PKCの阻害因子、IP<sub>3</sub>の活性化因子、G1bとp75との相互作用を抑制または消失する因子、p75とRho GDIとの相互作用を抑制または消失する因子、p75とRhoとの相互作用を抑制または消失する因子、RhoとRho GDIとの相互作用を維持または強化する因子、RhoGDPからRhoGTPへの変換を阻害する因子、RhoとRhoキナーゼとの相互作用を阻害する因子、およびRhoキナーゼの活性を阻害する因子からなる群より選択される少なくとも1つの因子であり得る。このような因子は、再生に有効な量で含有され得る。

## 【0934】

別の実施形態において、p75シグナル伝達経路を阻害する因子は、神経突起伸展の阻害を破壊または減少するに有効な量の、Pep5ポリペプチド、Pep5ポリペプチドをコードする核酸分子、PKCの阻害因子、IP<sub>3</sub>の活性化因子、p75ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、p75ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、p75細胞外ドメインポリペプチド、p75細胞外ドメインポリペプチドをコードする核酸分子、Rho GDIポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、Rho GDIポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、Rho GDIポリペプチド、Rho GDIポリペプチドをコードする核酸分子、MAGポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、MAGポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、p21ポリペプチド、p21をコードする核酸分子、Rhoポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、Rhoポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、Rhoキナーゼに対して特異的に相互作用する因子およびRhoキナーゼをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子ならびにその改変体およびフラグメントからなる群より選択される少なくとも1つの分子を含む。ここで、神経突起伸展の阻害を破壊または減少するに有効な量は、当該分野において周知の技法を用いて当業者が種々のパラメータを参酌しながら決定することができ、そのような量を決定するためには、例えば、使用目的、対象疾患（種類、重篤度など）、患者の年齢、体重、性別、既往歴、細胞の形態または種類などを考慮して、当業者が容易に決定することができる。

## 【0935】

別の好ましい実施形態では、本発明はまた、Pep5ポリペプチド、Pep5ポリペプチドをコードする核酸分子、PKCの阻害因子、IP<sub>3</sub>の活性化因子、p75ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、p75ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、p75細胞外ドメインポリペプチド、p75細胞外ドメインポリペプチドをコードする核酸分子、Rho GDIポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、Rho GDIポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、Rho GDIポリペプチド、Rho GDIポリペプチドをコードする核酸分子、MAGポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、MAGポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、p21ポリペプチド、p2



1 をコードする核酸分子、R h o ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、R h o ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、R h o キナーゼに対して特異的に相互作用する因子および R h o キナーゼをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子ならびにその改変体およびフラグメントを、複数含む、神経突起伸展の阻害を破壊または減少するための組成物を提供する。この場合、種々の組み合わせが利用され得る。好ましくは、2 つ、3 つあるいは 4 つのポリペプチド、ポリヌクレオチドおよび／または因子を用いることができる。別の好ましい実施形態では、経路上の複数の分子を阻害する物質を使用することが有利であり得る。

【0936】

本発明の組成物において使用される因子は、P T D ドメインを含んでいてもよい。

【0937】

本発明はまた、上述の組成物を備える、神経突起伸展の阻害を破壊または減少するためのキットにも関する。このようなキットは、本発明の組成物のほか、投与方法を記載した指示書を備え得る。このような指示書は、本明細書の他の場所において記載されている。

【0938】

本発明はまた、p 7 5 シグナル伝達経路を阻害する因子の、神経突起伸展の阻害を破壊または減少する医薬の製造のための使用に関する。

【0939】

(神経細胞のネットワーク構築)

本発明はまた、別の局面において、神経細胞のネットワークの構築のための組成物を提供する。この組成物および方法において、神経細胞における p 7 5 シグナル伝達経路を阻害する因子が包含されるか、または神経細胞における p 7 5 シグナル伝達経路を阻害する工程が包含される。

【0940】

ここで、神経細胞のネットワークの構築とは、複数の神経細胞の間で、有機的または情報が移転されるように細胞同士が連結されることをいう。そのようなネットワークを形成した神経細胞は、神経細胞集団ともいう。そのようなネットワークを形成した神経細胞としては、例えば、シナプス形成した神経細胞集団、脳、脊髄、末梢神経などが挙げられるがそれらに限定されない。

【0941】

1 つの実施形態において、本発明の神経細胞のネットワークの構築のための組成物および方法において、p 7 5 シグナル伝達経路の阻害は、p 7 5 シグナル伝達経路における伝達因子もしくはその改変体もしくはフラグメント、または p 7 5 シグナル伝達経路における伝達因子に対して特異的に相互作用する因子を再生に有効な量で前記神経細胞に提供することによって達成され得る。

【0942】

別の実施形態において、本発明の神経細胞のネットワークの構築のための組成物および方法において、p 7 5 シグナル伝達経路における伝達因子は、M A G、P K C、I P<sub>3</sub>、G T 1 b、p 7 5、R h o G D I、R h o、p 2 1 および R h o キナーゼからなる群より選択される少なくとも 1 つの伝達因子を含み得る。

【0943】

別の実施形態において、本発明の神経細胞のネットワークの構築のための組成物および方法において、p 7 5 シグナル伝達経路の阻害は、M A G と G T 1 b との相互作用の阻害、P K C の阻害、I P<sub>3</sub> の活性化、G T 1 b と p 7 5 との相互作用の阻害、p 7 5 と R h o との相互作用の阻害、p 7 5 と R h o G D I との相互作用の阻害、R h o と R h o G D I との相互作用の維持または強化、R h o G D P から R h o G T P への変換阻害、R h o と R h o キナーゼとの相互作用の阻害および R h o キナーゼの活性阻害からなる群より選択される相互作用の調節によってを包含する。

【0944】

この神経細胞のネットワークの構築のための組成物は、Pep5ポリペプチド、Pep5ポリペプチドをコードする核酸分子、PKCの阻害因子、IP<sub>3</sub>の活性化因子、p75ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、p75ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、p75細胞外ドメインポリペプチド、p75細胞外ドメインポリペプチドをコードする核酸分子、Rho GDIポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、Rho GDIポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、Rho GDIポリペプチド、Rho GDIポリペプチドをコードする核酸分子、MAGポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、MAGポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、p21ポリペプチド、p21をコードする核酸分子、Rhoポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、Rhoポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、Rhoキナーゼに対して特異的に相互作用する因子およびRhoキナーゼをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子ならびにその改変体およびフラグメントからなる群より選択される少なくとも1つの分子を含む。ここで、神経ネットワーク構築に有効な量は、当該分野において周知の技法を用いて当業者が種々のパラメータを参酌しながら決定することができ、そのような量を決定するためには、例えば、使用目的、対象疾患（種類、重篤度など）、患者の年齢、体重、性別、既往歴、細胞の形態または種類などを考慮して、当業者が容易に決定することができる。本発明では、神経の再生が、p75シグナル伝達経路を遮断することによって、神経突起伸展の阻害が破壊されることによることが明らかになった。このようなシグナル伝達経路の遮断による神経再生の効果は従来知られておらず、したがって、本発明は、従来技術より優れた効果を示す。

#### 【0945】

このようにネットワーク形成された神経細胞（集団）は、神経障害を伴う生物に移植することができる。

#### 【0946】

1つの実施形態では、Pep5ポリペプチド、Pep5ポリペプチドをコードする核酸分子、PKCの阻害因子、IP<sub>3</sub>の活性化因子、p75ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、p75ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、p75細胞外ドメインポリペプチド、p75細胞外ドメインポリペプチドをコードする核酸分子、Rho GDIポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、Rho GDIポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、Rho GDIポリペプチド、Rho GDIポリペプチドをコードする核酸分子、MAGポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、MAGポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、p21ポリペプチド、p21をコードする核酸分子、Rhoポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、Rhoポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、Rhoキナーゼに対して特異的に相互作用する因子およびRhoキナーゼをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子ならびにその改変体およびフラグメントは、本明細書において上記に記載されるような形態をとることができる。本発明では、神経の再生が、p75シグナル伝達経路を遮断することによって、神経突起伸展の阻害が破壊されることによることが明らかになった。このようなシグナル伝達経路の遮断による神経再生およびネットワーク形成の効果は従来知られておらず、したがって、本発明は、従来技術より優れた効果を示す。特に、Pep5ポリペプチド、Pep5ポリペプチドをコードする核酸分子、p75ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、PKCの阻害因子、IP<sub>3</sub>の活性化因子、p75ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、p75細胞外ドメインポリペプチド、p75細胞外ドメインポリペプチドをコードする核酸分子、Rho GDIポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、Rho GDIポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、Rho GDIポリペプチド、Rho GDIポリペプチドをコードする核酸分子、MAGポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、MAGポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、

する因子、p 2 1 ポリペプチド、p 2 1 をコードする核酸分子、R h o ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、R h o ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、R h o キナーゼに対して特異的に相互作用する因子および R h o キナーゼをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子ならびにその改変体およびフラグメントは、複数用いることが好ましくあり得る。そのような場合、種々の組み合わせが利用され得る。好ましくは、2 つ、3 つあるいは 4 つのポリペプチド、ポリヌクレオチドおよび／または因子を用いることができる。別の好ましい実施形態では、経路上の複数の分子が阻害されることが有利であり得る。

#### 【0947】

別の局面において、本発明は、神経細胞のネットワークの構築のための方法を提供する。この方法は、ネットワークの構築に有効な量の P e p 5 ポリペプチド、P e p 5 ポリペプチドをコードする核酸分子、P K C の阻害因子、I P 3 の活性化因子、p 7 5 ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、p 7 5 ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、p 7 5 細胞外ドメインポリペプチド、p 7 5 細胞外ドメインポリペプチドをコードする核酸分子、R h o G D I ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、R h o G D I ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、R h o G D I ポリペプチド、R h o G D I ポリペプチドをコードする核酸分子、M A G ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、M A G ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、p 2 1 ポリペプチド、p 2 1 をコードする核酸分子、R h o ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、R h o ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、R h o キナーゼに対して特異的に相互作用する因子および R h o キナーゼをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子ならびにその改変体およびフラグメントからなる群より選択される少なくとも 1 つの分子を含む組成物を該神経細胞に与える工程、を包含する。

#### 【0948】

(神経疾患処置キット)

別の局面において、本発明は、神経学的疾患を処置するためのキットを提供する。このキットは、(A) P e p 5 ポリペプチド、P e p 5 ポリペプチドをコードする核酸分子、P K C の阻害因子、I P 3 の活性化因子、p 7 5 ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、p 7 5 ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、p 7 5 細胞外ドメインポリペプチド、p 7 5 細胞外ドメインポリペプチドをコードする核酸分子、R h o G D I ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、R h o G D I ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、R h o G D I ポリペプチド、R h o G D I ポリペプチドをコードする核酸分子、M A G ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、M A G ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、p 2 1 ポリペプチド、p 2 1 をコードする核酸分子、R h o ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、R h o ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、R h o キナーゼに対して特異的に相互作用する因子および R h o キナーゼをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子ならびにその改変体およびフラグメントからなる群より選択される少なくとも 1 つの分子を含む組成物によって再生された細胞集団、(B) 該細胞集団を保存するための容器を包含する。

#### 【0949】

あるいは、このようなキットは、(A) P e p 5 ポリペプチド、P e p 5 ポリペプチドをコードする核酸分子、P K C の阻害因子、I P 3 の活性化因子、p 7 5 ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、p 7 5 ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、p 7 5 細胞外ドメインポリペプチド、p 7 5 細胞外ドメインポリペプチドをコードする核酸分子、R h o G D I ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、R h o G D I ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、R h o G D I ポリペプチド、R h o G D I ポリペプチドをコードする核

酸分子、MAGポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、MAGポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、p21ポリペプチド、p21をコードする核酸分子、Rhoポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、Rhoポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、Rhoキナーゼに対して特異的に相互作用する因子およびRhoキナーゼをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子ならびにその改変体およびフラグメントからなる群より選択される少なくとも1つの分子を含む組成物；(B) 神経細胞または神経細胞に分化することができる細胞、(C) 該細胞集団を保存するための容器を包含する。

#### 【0950】

上記キットは、神経細胞または神経細胞集団を必要とする疾患（神経疾患、神経障害、神経の異常状態など）の処置に有効である。形成された神経細胞および神経細胞集団は、どのような状態であってもよいが、分化状態が適合していることが好ましい。

#### 【0951】

本発明のキットにおいて提供される指示書は、指示を伝えることができる限り、どのような形態をとってもよく、紙、コンピュータ読み取り可能な記録媒体（例えば、フレキシブルディスク、CD-R）、電子メール、SMS、ボイスメール、インスタントメッセージウェブサイトなどであり得る。

#### 【0952】

別の局面において、神経学的疾患を処置するための方法を提供する。この方法は、(a) Pep5ポリペプチド、Pep5ポリペプチドをコードする核酸分子、PKCの阻害因子、IP<sub>3</sub>の活性化因子、p75ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、p75ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、p75細胞外ドメインポリペプチド、p75細胞外ドメインポリペプチドをコードする核酸分子、Rho GDIポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、Rho GDIポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、Rho GDIポリペプチド、Rho GDIポリペプチドをコードする核酸分子、MAGポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、MAGポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、p21ポリペプチド、p21をコードする核酸分子、Rhoポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、Rhoポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、Rhoキナーゼに対して特異的に相互作用する因子およびRhoキナーゼをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子ならびにその改変体およびフラグメントからなる群より選択される少なくとも1つの分子を含む組成物によって再生された細胞集団を提供する工程；および(b) 該細胞集団を該患者に移植する工程、を包含する。

#### 【0953】

このような細胞集団はまた、移植片とも呼ばれる。本明細書において「移植片」とは、通常、身体の特定部位に挿入されるべき同種または異種の組織または細胞群であって、身体への挿入後その一部となる。従来の移植片としては、例えば、臓器または臓器の一部、血管、血管様組織、皮片、心臓弁、心膜、硬膜、角膜骨片、歯などが使用されてきた。従って、移植片には、ある部分の欠損部に差し込んで欠損を補うために用いられるものすべてが包含される。移植片としては、そのドナー(donor)の種類によって、自己(自家)移植片(autograft)、同種移植片(同種異系移植片)(allograft)、異種移植片が挙げられるがそれらに限定されない。本明細書において「免疫反応」とは、移植片と宿主との間の免疫寛容の失調による反応をいい、例えば、超急性拒絶反応(移植後数分以内)( $\beta$ -Galなどの抗体による免疫反応)、急性拒絶反応(移植後約7~21日の細胞性免疫による反応)、慢性拒絶反応(3カ月以降の細胞性免疫による拒絶反応)などが挙げられる。本明細書において免疫反応を惹起するかどうかは、HE染色などを含む染色、免疫染色、組織切片の検鏡によって、移植組織中への細胞(免疫系)浸潤について、その種、数などの病理組織学的検討を行うことにより判定することができる。

## 【0954】

細胞集団の提供は、本明細書において他の場所において詳述されている。細胞を患者に移植する技術もまた、当該分野において周知の技術を用いることができる。そのような方法は、標準外科学（医学書院）、新外科学大系（中山書店）などに記載されている。本発明の移植片の移植に際しては、上述の一般的な方法において、過大な圧がかからないということに留意することが好ましくあり得る。

## 【0955】

本発明の移植片または細胞集団は、その中にかまたはそれに伴って、免疫抑制剤をさらに含んでいてもよい。そのような免疫抑制剤は、当該分野において公知である。免疫抑制の目的では、免疫抑制剤のほか、免疫抑制を達成する別の方法を用いてもよい。上述のような拒絶反応を起こさないようにする免疫抑制法として、免疫抑制剤によるもの、外科的手術、放射線照射等が挙げられる。まず、免疫抑制剤として主なものとして副腎皮質ステロイド薬、シクロスポリン、FK506等がある。副腎皮質ステロイド薬は循環性T細胞の数を減少させ、リンパ球の核酸代謝、サイトカイン産生を阻害してその機能を抑え、マクロファージの遊走および代謝を抑制して免疫反応を抑える。一方、シクロスポリンおよびFK506の作用は類似しており、ヘルパーT細胞の表面にあるレセプターと結合して細胞内に入り込み、DNAに直接働いてインターロイキン2の生成を阻害する。最終的には、キラーT細胞が機能できなくなり免疫抑制作用が起こる。これらの免疫抑制剤の使用においては副作用が問題となる。ステロイドは特に副作用が多く、また、シクロスポリンは肝臓・腎臓に対する毒性がある。また、FK506は腎臓に対する毒性を有する。次に外科的手術としては、例えば、リンパ節摘出、脾臓摘出、胸腺摘除が挙げられるが、これらについてはその効果が十分に証明されてはいない。外科的手術の中でも胸管ろうとは、循環しているリンパ球を体外に導くものであり効果も確認されているが、大量の血清タンパク質および脂肪の流出を引き起こし、栄養障害が起こりやすくなるという欠点がある。放射線照射には全身照射と移植片照射があるが、効果が不確実な面もあり、レシピエントに対する負担が大きいので、前述の免疫抑制剤との併用により利用されている。上述のいずれの方法も拒絶反応の防止にはあまり好ましくない。

## 【0956】

（スクリーニング）

本発明はまた、神経再生を誘導する因子を同定するためのスクリーニング方法を提供する。この方法では、Pep5ポリペプチド、Pep5ポリペプチドをコードする核酸分子、PKC、PKCの阻害因子、IP<sub>3</sub>、IP<sub>3</sub>の活性化因子、p75ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、p75ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、p75細胞外ドメインポリペプチド、p75細胞外ドメインポリペプチドをコードする核酸分子、RhogDIポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、RhogDIポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、RhogDIポリペプチドをコードする核酸分子、MAGポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、MAGポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、p21ポリペプチド、p21をコードする核酸分子、Rhogポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、Rhogポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、Rhogキナーゼに対して特異的に相互作用する因子およびRhogキナーゼをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子ならびにその改変体およびフラグメントからなる群より選択される少なくとも1つの分子とそれらに相互作用する分子との相互作用に、試験因子が有意に影響を与える（減少、増強、消失など）かどうかを判定することによって同定することができる。

## 【0957】

1つの実施形態において、この方法は、（a）配列番号4に少なくとも70%相同性であるアミノ酸配列を有する第1のポリペプチドまたはそのフラグメントおよび配列番号6に少なくとも70%相同性であるアミノ酸配列を有する第2のポリペプチドまたはそのフ

ラグメントを、試験因子の存在下で接触させる工程、および(b)該第1のポリペプチドと該第2のポリペプチドとの間の結合レベルを、該試験因子の非存在下における結合レベルと比較する工程、を包含し、ここで、該試験因子の非存在下と比較して、試験因子の存在下において結合が減少した場合、該試験因子は、神経を再生するための因子として同定される。

#### 【0958】

このような試験因子の判定方法は、当該分野において周知であり、任意の統計学的手法を用いて結果を算出することができる。

#### 【0959】

本発明の同定方法において、被検体・患者の提示、選択は任意に行うことができるが、被検体がヒトである場合、コンセンートを事前にもらっておくことが好ましい。被検体としては、神経状態が正常ではないものを提供することができる限りどのようなものでも選択することができる。

#### 【0960】

本発明の同定方法において、次に、本発明の同定方法で用いられる投与工程は、どのような技術を用いてもよい。好ましくは、経口投与、静脈注射など、通常の治療において使用される形態であることが有利である。

#### 【0961】

このようなスクリーニングまたは同定の方法は、当該分野において周知であり、例えば、そのようなスクリーニングまたは同定は、マイクロタイタープレート、DNAまたはプロテインなどの生体分子アレイまたはチップを用いて行うことができる。スクリーニングの試験因子を含む対象としては、例えば、遺伝子のライブラリー、コンビナトリアルライブラリーで合成した化合物ライブラリーなどが挙げられるがそれらに限定されない。

#### 【0962】

したがって、本発明では、本発明の開示をもとに、コンピュータモデリングによる薬物が提供されることも企図される。

#### 【0963】

本発明は、他の実施形態において、本発明の化合物に対する調節活性についての有効性のスクリーニングの道具として、コンピュータによる定量的構造活性相関 (quantitative structure activity relationship=QSAR) モデル化技術を使用して得られる化合物を包含する。ここで、コンピューター技術は、いくつかのコンピュータによって作成した基質鑄型、ファーマコフォア、ならびに本発明の活性部位の相同モデルの作製などを包含する。一般に、インビトロで得られたデータから、ある物質に対する相互作用物質の通常の特性基をモデル化するのは、CATALYST<sup>TM</sup> ファーマコフォア法 (Ekins et al., Pharmacogenetics, 9:477~489, 1999; Ekins et al., J. Pharmacol. & Exp. Ther., 288:21~29, 1999; Ekins et al., J. Pharmacol. & Exp. Ther., 290:429~438, 1999; Ekins et al., J. Pharmacol. & Exp. Ther., 291:424~433, 1999) および比較分子電界分析 (comparative molecular field analysis; CoMFA) (Jones et al., Drug Metabolism & Disposition, 24:1~6, 1996) などを使用して示されている。本発明において、コンピュータモデリングは、分子モデル化ソフトウェア (例えば、CATALYST<sup>TM</sup> バージョン4 (Molecular Simulations, Inc., San Diego, CA) など) を使用して行われ得る。

#### 【0964】

活性部位に対する化合物のフィッティングは、当該分野で公知の種々のコンピュータモデリング技術のいずれかを使用して行うことができる。視覚による検査および活性部位に対する化合物のマニュアルによる操作は、QUANTA (Molecular Sim

ulations, Burlington, MA, 1992)、SYBYL (Molecular Modeling Software, Tripos Associates, Inc., St. Louis, MO, 1992)、AMBER (Weiner et al., J. Am. Chem. Soc., 106:765~784, 1984)、CHARMM (Brooks et al., J. Comp. Chem., 4:187~217, 1983) などのようなプログラムを使用することができる。これに加え、CHARMM、AMBERなどのような標準的な力場を使用してエネルギーの最小化を行うこともできる。他のさらに特殊化されたコンピュータモデリングは、GRID (Goodford et al., J. Med. Chem., 28:849~857, 1985)、MCSS (Miranker and Karplus, Function and Genetics, 11:29~34, 1991)、AUTODOCK (Goodsell and Olsen, Proteins: Structure, Function and Genetics, 8:195~202, 1990)、DOCK (Kuntz et al., J. Mol. Biol., 161:269~288, (1982)) などを含む。さらなる構造の化合物は、空白の活性部位、既知の低分子化合物における活性部位などに、LUDI (Bohm, J. Comp. Aid. Molec. Design, 6:61~78, 1992)、LEGEND (Nishibata and Itai, Tetrahedron, 47:8985, 1991)、LeapFrog (Tripos Associates, St. Louis, MO) などのようなコンピュータプログラムを使用して新規に構築することもできる。このようなモデリングは、当該分野において周知慣用されており、当業者は、本明細書の開示に従って、適宜本発明の範囲に入る化合物を設計することができる。

#### 【0965】

別の局面において、本発明は、本発明の上記同定方法によって同定される、調節因子を提供する。

#### 【0966】

別の局面において、本発明は、本発明の調節因子を含む、薬学的組成物を提供する。

#### 【0967】

別の局面において、本発明は、神経学的疾患、障害または状態を、予防または処置する方法を提供する。ここで、この方法は、本発明の調節因子を含む薬学的組成物を被験体に投与する工程を包含する。好ましくは、この神経に関連する状態、障害または疾患は、同定方法において有効であると判断された異常、障害または疾患であり、好ましくはアルツハイマー病を包含するがそれに限定されない。

#### 【0968】

神経に関連する疾患、障害および状態は、その治療について根本的な治療が困難といわれてきた。しかし、本発明の上述のような効果によって、従来では不可能とされていた早期診断が可能となり、治療にも応用することができることが明らかとなった。したがって、本発明は、従来の診断薬でも医薬でも達成不可能であった有用性を有するといえる。

#### 【0969】

(トランスジェニック動物)

別の局面において、本発明はまた、MAG、Nogo、PKC、IP<sub>3</sub>、G<sub>T</sub>1b、p75、Rho GDI、Rho、p21およびRhoキナーゼからなる群より選択される少なくとも1つの伝達因子あるいはその調節因子（たとえば、Pep5ポリペプチドをコードする核酸分子、p75ポリペプチドをコードする核酸分子およびRho GDIポリペプチド）をコードする核酸分子からなる群より選択される少なくとも1つの核酸分子の配列において野生型とは異なる配列が導入された配列を有する核酸分子を含む、ベクターを提供する。このベクターは、種々の目的で用いることができ、例えば、トランスジェニック動物の生産、改変ポリペプチドの産生などが挙げられるがそれらに限定されない。

#### 【0970】

したがって、本発明は、このようなベクターを含む、細胞、組織、臓器、生物を提供す

る。また、本発明はまた、このようなベクターで形質転換された神経改変トランスジェニック動物を提供する。動物を作製する方法は、東亜異分野において公知である。

【0971】

別の局面において、本発明は、本発明の遺伝子がノックアウトされたノックアウト動物を提供する。

【0972】

本明細書において、「ノックアウト」とは、遺伝子について言及されるとき、その遺伝子を破壊（欠損）または機能不全にさせることをいう。

【0973】

本明細書において、「ノックアウト動物」とは、ある遺伝子がノックアウトされた動物（例えば、マウス）をいう。

【0974】

本明細書において、「動物」は、ノックアウトすることができるものであればどのような動物であってもよい。従って、動物には、脊椎動物および無脊椎動物が包含される。動物としては、哺乳動物（例えば、マウス、イヌ、ネコ、ラット、サル、ブタ、ウシ、ヒツジ、ウサギ、イルカ、クジラ、ヤギ、ウマなど）、鳥類（例えば、ニワトリ、ウズラなど）、両生類（例えば、カエルなど）、爬虫類、昆虫（例えば、ショウジョウバエなど）などが挙げられる。好ましくは、動物は、哺乳動物であり得、より好ましくは、ノックアウトを作製することが容易な動物（例えば、マウス）であり得る。別の好ましい形態では、動物は、ヒトのモデル動物として適切であることが判明している動物（例えば、サル）であり得る。ある実施形態では、動物は、非ヒト動物であり得るが、それに限定されない。

【0975】

本発明はまた、本発明の因子（例えば、ポリペプチドなど）の、本発明の目的（例えば、神経疾患、障害、異常状態の治療、診断、予防、処置、予後など）のための使用または医薬組成物の製造のための本発明の因子の使用に関する。それらの詳細な実施形態は上述したものと同様であり、当業者は適宜応用することができる。

【0976】

以下に、実施例に基づいて本発明を説明するが、以下の実施例は、例示の目的のみに提供される。従って、本発明の範囲は、実施例のみに限定されるものではなく、特許請求の範囲によってのみ限定される。

【実施例】

【0977】

以下に実施例を示して本発明をさらに詳しく説明するが、この発明は以下の例に限定されるものではない。動物の取り扱い、大阪大学において規定される基準を遵守し、動物愛護精神に則って実験を行った。

【0978】

（実施例1：p75は、ミエリン結合タンパク質からRhoにシグナルを伝達する）  
（材料および方法）  
（動物）

p75遺伝子の第3エキソンの破壊が標的化されたマウス系統（Lee, K. F. ら、Cell 69:737-749、1992）を使用した。このマウスは、C57BL/6Jバックグラウンドで、最初はJackson ImmunoResearch Laboratoriesから入手した。

【0979】

（神経突起伸展アッセイ）

DRGを、成体マウスから取り出し、そして0.025%トリプシンおよび0.15%1型コラゲナーゼ（Sigma Aldrich）を用いた37℃で30分間のインキュベーションによって、単一細胞に分離させた。小脳ニューロンについて、2匹の動物由来の小脳を、5mlの0.025%トリプシン中で合わせ、粉碎し、そして37℃で10分間インキュベートした。10%FCSを含むDMEMを添加し、細胞を800r



pmにて遠心分離した。ニューロンを、ポリ-L-リジンでコーティングしたチャンバスライド上のSato培地(Cai, D., Y. Shen, M. De Bellard, S. Tang, およびM. T. Filbin. 1999, , Neuron 22: 89-101)中、プレートに播いた。伸展アッセイについて、プレートに播いた細胞を、24時間インキュベートし、そして4%(重量/容積)パラホルムアルデヒド中で固定し、そしてニューロン特異的 $\beta$ チューブリンIIIタンパク質を認識するモノクローナル抗体(TuJ1)を用いて免疫染色した。次いで、各 $\beta$ チューブリンIII陽性ニューロンの最も長い神経突起の長さまたは総突起物の伸展を、決定した。示される場合、細胞をプレートに播いた後、組換えラットMAG-Fcキメラ(R & D Systems)を、培地に添加した。組換えC3トランスフェラーゼを、以前に記載されたように(Borasio, G. D., J. John, A. Wittinghofer, Y. A. Barde, M. Sendtner, およびR. Heumann. 1989, , Neuron 2: 1087-1096)粉碎によって、プレートに播く前にニューロンの細胞質に導入した。

【0980】

(GTP-RhoAのアフィニティー免疫沈降)

293細胞を、NH<sub>2</sub>末端をHAタグ化した野生型RhoA(Yamashita, T. ら, Neuron 24: 585-593, 1999)および/または全長ヒトp75を含むpcDNA3ベクターを用いて、Lipofectamine 2000(GIBCO BRL)を用いたりポフェクションによってトランスフェクトした。P9マウス由来の小脳ニューロンを、以前に記載されたように(Cai, D. ら, Neuron 22: 89-101, 1999)単離した。細胞を、50mM Tris(pH7.5)、1% Triton X-100、0.5% デオキシコール酸ナトリウム、0.1% SDS、500mM NaCl、および10mM MgCl<sub>2</sub>、ならびに10 $\mu$ g/ml ロイペプチンおよび10 $\mu$ g/ml アプロチニン中に溶解した。細胞溶解物を、13,000g、4℃で10分間の遠心分離によって清澄化し、そして上清を、Rhotekinビーズ(Upstate Biotechnology)のGST-Rho結合ドメインの20 $\mu$ gと共に4℃で45時間インキュベートした。このビーズを、洗浄緩衝液(1% Triton X-100、150mM NaCl、10mM MgCl<sub>2</sub>、10 $\mu$ g/ml ロイペプチンおよび10 $\mu$ g/ml アプロチニンを含む50mM Tris(pH7.5))を用いて4回洗浄した。結合したRhoタンパク質を、RhoAに対するモノクローナル抗体(Santa Cruz Biotechnology)を用いてウエスタンブロッティングによって検出した。

【0981】

(MAG-Fc結合および免疫細胞化学)

DRGニューロン培養物を、PBS中の1%パラホルムアルデヒド中、30分間固定した。次いで、これらの培養物を、2% FCSを含むPBSを用いてブロックした。MAG結合分子を局在化させるために、固定しかつブロックしたDRGニューロンに添加する前に、MAG-Fc(5 $\mu$ g/ml)および抗ヒトIgG(1 $\mu$ g/ml)を、室温にて30分間予備的に複合体化した(Turnley, A. M. およびP. F. Bartlett, Int. J. Dev. Neurosci. 17: 109-119, 1999)。p75を同定するために、細胞を、0.2% Triton X-100/PBSを用いて透過処理し、次いで、p75に対するポリクローナル抗体(Promega)と共に一晩インキュベートし、次いで、Alexa fluor<sup>TM</sup> 568標識抗ウサギIgG(Molecular Probes)と1時間インキュベートした。抗体の特異性を、このタンパク質を発現する細胞のウエスタンブロット分析によって評価し、免疫細胞化学のコントロール実験を、一次抗体を外すことによって実行した。

【0982】

(組換えp75とGT1bとの同時免疫沈降)

組換えヒトp75-Fcキメラ(1 $\mu$ g; Genzyme-Techne)および1 $\mu$ gの精製ガングリオシドGT1b(98%より高い純度; Seikagaku Co.)

を、 $200\mu\text{l}$  0.025% Tween 20/PBS中で2時間インキュベートし、そしてp75をプロテインAセファロース (Amersham Pharmacia Biotech) を用いて沈降した。生じる沈降物を、7%ゲルを用いたSDS-PAGEの後、ニフツ化ポリビニリデンメンブランに電氣的に転写し、そして抗GT1b抗体 (IgM; Seikagaku Co.) または抗p75抗体を用いて免疫プロットした。

#### 【0983】

(同時免疫沈降実験)

細胞を、溶解緩衝液 (10mM Tris-HCl (pH7.5)、150mM NaCl、1% Triton X-100、 $25\mu\text{g}/\text{ml}$  ロイペプチン、および $25\mu\text{g}/\text{ml}$  アプロチニン) を用いて20分間氷上で溶解した。溶解物を、13,000gで20分間遠心分離し、そして上清を、収集した。次いで、これらの上清を、抗GT1b抗体または抗HA抗体 (トランスフェクトしたHA-p75について) と共に1晩インキュベートし、次いで、抗マウスIgM抗体 (GT1bについて) と共にインキュベートした。免疫複合体またはMAG-Fcを、プロテインAセファロース (Amersham Pharmacia Biotech) を用いて収集した。懸濁液を参照のこと、1,000gで5分間遠心分離した。ペレットを、溶解緩衝液を用いて4回洗浄し、SDS-PAGE、次いで免疫プロット分析に供した。

#### 【0984】

(実施例1-1: 神経突起伸展の阻害は、p75に依存する)

本発明者らはまず、p75がニューロン上でMAGの効果と関連するか否かを調べた。p75遺伝子に変異を保有するマウス (Lee, K. F. ら, Cell 69:737-749, 1992) および野生型マウス由来の成体DRGニューロンの神経突起伸展を調べた。

#### 【0985】

ヒトIgGのFc領域に融合したMAGの細胞外ドメインからなるMAGの可溶性キメラ形態 (MAG-Fc) を使用した。可溶性MAG (ミエリンから豊富に放出され、インビボで見出される) およびMAG-Fcが軸索成長を強力に阻害し得ることが示されている (Tang, S. ら, J. Cell Biol. 138:1355-1366, 1997a; Tang, S. ら, Mol. Cell. Neurosci. 9:333-346, 1997b)。本発明者らは、MAG処理ニューロンとMAG未処理ニューロンとの間で神経突起の長さを比較した。 $25\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度のMAG-Fcは、成体野生型マウスからのDRGニューロンの神経突起伸展を阻害した (図1、AおよびB)。Fcは、ニューロンに何の影響も与えなかった。興味深いことに、MAGの阻害効果は、p75遺伝子に変異を保有する成体マウス由来のDRGニューロン中で観察され得なかった。測定したものが総突起の伸展であっても最も長い神経突起の長さであっても、まさに同じ結果が得られた。

#### 【0986】

生後小脳ニューロンを用いた類似の実験を実行した。 $25\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度のMAG-Fcにおいて、神経突起成長は、P9野生型マウス由来の小脳ニューロンを使用した場合、有意に阻害された (図1C)。さらに、MAGによる阻害は、p75遺伝子に変異を保有するP9マウス由来のニューロン中では観察されなかった。これらの結果は、MAGが、p75依存性機構によって神経突起伸展を阻害することを示唆する。

#### 【0987】

p75は、インビボおよびインビトロにおいて軸索成長の阻害に必要であることが示され、末梢ニューロンの神経支配を標的化し (Kimpinski, K. ら, Neuroscience 93:253-263, 1999; Kohn, J. ら, J. Neurosci. 19:5393-5408, 1999)、そしてインビボにおいてコリン作動性ニューロンの過剰神経支配の抑制に必要であること (Yeo, T. T. ら, J. Neurosci. 17:7594-7605, 1997) が示された。近年、小脳の有髄部分内の交感神経系軸索の成長が、インビボにおいて、p75を発現するマウスと比較して、p7

5の発現を欠くNGFトランスジェニックマウス中で大きいことが報告された(Walsh, G. S. ら, J. Neurosci. 19:4155-4168, 1999)。これは、本発明者らのデータを支持する関連する知見であり得る。なぜなら、p75遺伝子に変異を保有するニューロンは、阻害因子に無反応性であることが示唆されるからである。

#### 【0988】

(実施例1-2:ニューロン上でのMAGのシグナル伝達機構)

いくつかのニューロンは、RhoAが不活性化の場合に急速に神経突起を伸展し、そして神経突起収縮は、RhoAが活性化の場合に生じる(Davies, A. M., Curr. Biol. 10:R198-R200, 2000)。以前の研究によって、RhoAの不活性化が、インビボにおいて軸索再生を促進したことが示された(Lehmann, M. ら, J. Neurosci. 19:7537-7547, 1999)。従って、RhoAの活性化が、本発明者らの系のMAGによる神経突起伸展の調節に必要であるか否かを調べた。

#### 【0989】

RhoAの活性化が、MAGによる神経突起伸展の調節に必要であるか否かを調べるために、本発明者らは、ADPをRhoAにリボシル化するClostridium botulinum由来の外毒素C3トランスフェラーゼを使用した。組み換えC3トランスフェラーゼを、粉碎によってDRGニューロンの細胞質に導入した。C3トランスフェラーゼは、野生型マウス由来のDRGニューロンに対するMAGの効果を完全に破壊した(図2A)。これらのデータは、以前の報告と一致し、RhoAがMAGシグナル伝達経路上にあることを示唆する(Lehmann, M. ら, J. Neurosci. 19:7537-7547, 1999)。

#### 【0990】

試験した次の仮説は、MAGがp75依存性機構によってRhoAの活性を調節するか否かという仮説である。内因性にp75を発現しない293細胞を使用し、MAG-Fcの細胞表面への結合は、分散して観察された(図2B)。エフェクタータンパク質であるRhotekin(Ren, X. D. ら, EMBO J. 18:578-585, 1999)のRhoA結合ドメインを使用して、GTP結合形態のRhoAを、アフィニティー沈降し得た。細胞中のRhoA活性の直接的な測定を、この方法を用いて実行し得た。このアッセイによって、可溶性MAG(25 µg/ml)の添加後30分以内に、p75およびRhoAをトランスフェクトした293細胞の抽出物は、コントロールと比較して、劇的に増加した量のGTP-RhoAを含み(図2C)、一方、Fcの添加によって活性の変化は観察されなかったことが明らかとなった。しかし、MAG-Fcの添加によるGTP-RhoA含量における増加は、p75をトランスフェクトしていない細胞において観察されなかった(図2C)。

#### 【0991】

タンパク質が人工的に発現される場合のRhoA活性の調節を、天然の細胞中で検出することは困難であり得る。従って、RhoA活性が内因性p75を発現する細胞中でMAGによって調節されるか否かを確認するために、生後小脳顆粒ニューロンを使用した。なぜなら、これらのニューロンもまた、神経突起伸展に関してMAGに感受性であるからである。トランスフェクトされた293細胞中での観察と一致して、MAG-Fcは、野生型マウス(P9)由来の小脳顆粒ニューロン(これは、p75を豊富に発現する)中でRhoAを活性化する(図3A)。この急速な活性化は、ニューロンに対するNGFの効果(これもまた、p75によって媒介される)と対照的であった(図3B)。なぜなら、これらのニューロンは、NGFレセプターであるtrkAを発現しないことから、NGFの効果は、p75によって媒介されるからからである。RhoA活性(図3C)および神経突起伸展に対するMAGの効果は、25 µg/mlの濃度のMAGで飽和されるようである。MAGによるRhoAの活性化は、p75遺伝子に変異を保有するマウス由来のニューロンでは失われていた(図3D)。これらのデータは、MAGがp75依存性機構によってRhoAを活性化し、ゆえに、生後小脳顆粒ニューロンの神経突起伸展を阻害する

、ということを実証する。

【0992】

優先的にGDP結合形態であるが、RhoAの構成的活性形態ではないRhoAの野生型のみが、p75と相互作用する(Yamashita, T. ら, Neuron. 24; 585-593, 1999)。トランスフェクト細胞において、p75の過剰発現は、ニューロトロフィン依存性様式でRhoAを活性化した。従って、RhoAのGDP結合形態は、MAGへの曝露後に、p75ヘリックスドメインと相互作用し活性化され得る。p75のより詳細な構造機能分析は、p75によるRhoA活性の調節の正確な機構を解明することを補助するはずである。

【0993】

(実施例1-3: p75およびMAG結合の同時局在)

MAGはシアル酸依存性様式でニューロンに結合するが、MAGのシアル酸結合部位は、その神経突起阻害活性とは異なる。MAGへのシアル酸依存性結合は、MAGの阻害効果に十分でも必要でもない(Tang, S. ら, J. Cell Biol. 138:1355-1366, 1997a)。従って、MAGの結合パートナーおよびシグナル伝達エレメントがレセプター複合体を形成し得る可能性がある。本発明者らは、MAGの結合パートナーおよびp75が、シス様式で相互作用し得ると想定した。この仮説を試験するために、p75およびMAG結合の局在を、細胞レベル下で評価した。

【0994】

MAG-Fcの結合を、蛍光タグ化抗ヒトIgGを用いたインキュベーションによって可視化した。図4は、共焦点レーザー顕微鏡を用いた成体DRGニューロンに対するMAG-Fcの結合を示す。MAG-Fc結合は、斑点状のようである。同じ細胞を、抗p75抗体を用いて染色し、そして分布を評価した。細胞体でのp75発現は、細かい小斑点染色を示した神経突起上よりも分散していた(図4A、上部)。p75免疫反応性の斑点の大部分は、MAG結合と同時に局在した。高倍率において、神経突起原形質膜上のホットスポットの類似した分布から、同時局在は明らかであった(図4A、下部)。MAG-Fcの結合は、p75遺伝子に変異を保有するマウス由来のDRGニューロンにおいてもなお観察された(図4B)。これらのデータは、p75およびMAG結合の同時局在を実証する。

【0995】

(実施例1-4: p75は、ガングリオシドGT1bに結合する)

本発明者らは次に、マウス由来の生後小脳から調製した溶解物を用いて、内因性p75とMAGの相互作用を調べた。MAG-Fc沈降物において、抗p75抗体によって、p75に対応するタンパク質の存在が明らかになった(図5A)。しかし、MAG-Fcは、本発明者らの予備実験において組換えp75タンパク質を沈降しなかったことから、これらのデータは、MAGとp75との間接的な相互作用を示唆する。従って、p75は、結合パートナーではないが、シグナル伝達エレメントであり得る。

【0996】

MAGは、ニューロンの細胞表面上に存在する特定のシアリル化されたグリカンおよびガングリオシドに結合する。末端 $\alpha$ -2-3連結シアル酸を保有する特定のガングリオシドに結合するMAGの能力は、十分に記載されている(Yang, L. J. ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93:814-818, 1996)。MAGは、GT1bおよびGD1a、ならびに $\alpha$ 系列のガングリオシドに結合することが示され、そしてGD1aではなく細胞表面GT1bの抗体架橋は、MAGの効果を模倣する(Vinson, M. ら, J. Biol. Chem. 276:20280-20285, 2001)。複合ガングリオシドノックアウトマウスの神経系の病的特徴は、MAGの遺伝子が破壊されたマウスで報告された特徴と非常に類似する(Sheikh, K. A. ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 96:7532-7537, 1999)。これらのデータから、本発明者らは、p75とこれらのガングリオシドとの会合を試験することを試み、p75およびガングリオシドがMAGに対するレセプター複合体を形成す

ることを予測した。

#### 【0997】

Sf21細胞から精製した、Fcに融合した組換えp75細胞外ドメインを使用して、ガングリオシドを沈降した。p75沈降物において、抗GT1b抗体によって、約100 kDのバンドの存在が明らかになった(図5B、左)。ポジティブバンドがp75であることを確認するために、抗GT1b抗体をメンブランから取り除き、そしてこのメンブランを、抗p75抗体を用いて再プローブ化した。この結果によって、ポジティブバンドがp75であることが示された(図5B、右)。これは、GT1bの非特異的相互作用ではない。なぜなら、EGFレセプターの細胞外ドメインとGT1bとの会合は観察されなかったからである。従って、GT1bは、SDS耐性様式でp75に結合する。GD1aもまた、MAGと会合することが示されたが(Vinson, M. ら, J. Biol. Chem. 276:20280-20285, 2001)、本発明者らは、p75とGD1aとのいかなる相互作用も見出さなかった(図5C)。さらに、p75とGM1との相互作用も見出されなかった(図5C)。これらのことは、p75とGT1bとの特異的な相互作用を実証する。抗GT1b抗体を用いて、本発明者らは、マウス由来の生後小脳から調製した溶解物を使用して、内因性p75とGT1bとの相互作用を調べた。抗体を用いた免疫細胞化学によって、これらのニューロン表面上でのGT1bの発現が確認された。GT1b免疫沈降物において、抗p75抗体によって、p75に対応するタンパク質の存在が明らかになった(図5D)。抗GT1b抗体と合成GT1bとのプレインキュベーションによって、p75の検出がなくなった。最後に、本発明者らは、トランスフェクト293細胞(この細胞は、細胞表面上にGT1bを豊富に発現する)を用いてp75とGT1bとの相互作用を評価した。予想したように、免疫沈降されたp75は、SDS耐性様式で、GT1bと複合体化した(図5E)。これらのデータは、GT1bとp75とがMAGに対するレセプター複合体を形成することを示唆する。

#### 【0998】

上記の結果から、p75は二重のシグナルを誘発する分子であると考えられる。p75は、単にニューロトロフィン(例えば、CRNF)(Fainzilber, M. ら, Science 274:1540-1543, 1996)または狂犬病ウイルス糖タンパク質(Tuffereau, C. ら, EMBO J. 17:7250-7259, 1998)に結合するだけではないことが示されているが、これらのリガンドが任意のシグナルをp75を通して誘発するか否かは知られていない。従って、p75が、ニューロトロフィンだけでなく、MAGのシグナル伝達因子でもあるということを実証する本発明者らの知見は、興味深いものである。さらに興味深いことに、p75に結合するニューロトロフィンは、RhoA活性を阻害することによって、おそらくニューロンの軸索伸展を促進する(Yamashita, T. ら, Neuron. 24:585-593, 1999)が、MAGは、RhoAを活性化することによって、p75を介してニューロンに対して反対の効果を誘発する。これは、p75が伝達エレメントとして二重のシグナルを有することを意味する。本質的に全ての成体ニューロンがMAGによる阻害に感受性である。一方、p75が制限された分布することに注目することもまた、重要である。MAGシグナルの同定および特徴づけは、ニューロンが細胞外阻害分子に応答するという以前は認識されていなかった機構を解明する。

#### 【0999】

(実施例2:細胞質p21は、Rhoキナーゼ活性を阻害することによって、神経突起リモデリングを調節する)

実施例1によって示されるように、p75が双方向性シグナルを誘発することが示された。本発明者らは次に、p75によるRho活性の調節の正確な機構について分析した。

#### 【1000】

(方法)

(材料および方法)

(動物)

p75遺伝子の第3エキソンの標的化された崩壊を保有するマウス系統 (Lee, K. F. et al. Cell 69, 737-749 (1992)) を使用した。このマウスは、C57BL/6Jバックグラウンドで、最初はJackson Laboratory (Bar Harbor, Maine) から入手した。

#### 【1001】

(同時免疫沈降)

アミノ末端をFLAGタグ化したヒトp75 (配列番号3および4) および/またはH Aタグ化RhoA (Yamashita, T., et al. Neuron 24, 585-593 (1999)) (配列番号11および12) を、Lipofectamine 2000 (Gibco BRL) を用いてリポフェクションによって293T細胞またはNIH-3T3細胞にトランスフェクトした。細胞を、溶解緩衝液 (10mM Tris-HCl (pH 7.5), 150mM NaCl, 0.2% NP-40, 25μg/ml ロイペプチンおよび25μg/ml アプロチニン) を用いて20分間氷上で溶解した。この溶解物を、20分間13,000gで遠心分離し、そしてこの上清を収集した。次いでこれらを、抗FLAG抗体 (FLAG-p75でトランスフェクトしたものに対して) または抗p75抗体 (Chemicon) (小脳ニューロンに対して) を用いて3時間インキュベートした。免疫複合体を、プロテインAセファロース (Amersham Pharmacia) を用いて収集した。懸濁液を、1,000gで5分間遠心分離した。このペレットを、溶解緩衝液を用いて4回洗浄し、SDS-PAGEに供し、続いて抗Rho GDIα抗体 (Sigma) または抗RhoA抗体 (Santa Cruz Biotechnology) を用いて免疫プロット分析に供した。示された場合、組換えラットMAG-Fcキメラ (25μg/ml, RD Systems Inc.), Nogoペプチド (4μM, Alpha Diagnostic; 配列番号10)、TAT (PTDドメイン) 融合Pep5 (TAT-CFFRGGFFNHNPYCY) (配列番号2)、またはTAT (PTDドメイン) 融合コントロールペプチド (TAT-GGWKWWPGIF) (配列番号15) を使用した。これらのペプチドを、化学合成し、そしてその組成物を、アミノ酸分析および質量分析法 (Sigma Genosys) によって確認した。アミノ末端をFLAGタグ化したヒトp75を、pcDNA3.1発現プラスミド (Invitrogen) にクローニングした。

#### 【1002】

(p75およびRho GDIの同時免疫沈降)

抗FLAG抗体およびプロテインAセファロースを用いてトランスフェクトした293T細胞から沈降したp75を、200μlの緩衝液 (20mM Tris-HCl (pH 7.5), 100mM NaCl, 10mM EDTA, 0.025% Tween 20) 中で組換えヒトGST-Rho GDI (Cytoskeleton) またはGST-RhoA (Cytoskeleton) と共に2時間インキュベートし、洗浄した。得られる沈降物を、SDS-PAGE後に二フッ化ポリビニリデン膜に電気泳動的に転写し、そして抗GST抗体 (Sigma) を用いてイムノプロットした。ヌクレオチド依存性を調べるために、GST-RhoAを、適切なヌクレオチドを用いてプレロードし、そしてEDTAを10mM MgCl<sub>2</sub> と置換した。示された場合、Pep5またはコントロールペプチド (GGWKWWPGIF (配列番号15)) を使用した。

#### 【1003】

(組換えタンパク質の産生)

欠失を有するかまたは有さないp75 ICDコード配列を、pGEX-5X細菌発現ベクター (Amersham Biosciences) にクローニングして、E. coli からGST融合タンパク質を作製した。pGEX-GST-Rho GDIは、Y. Takai博士から提供された。細胞を600nm (OD<sub>600</sub>) で1.0の光学濃度に増殖させた後、1mM イソプロピル-1-チオ-β-D-ガラクトピラノシド (IPTG) を添加してタンパク質合成を誘導し、そして細胞をさらに16時間25℃にて増殖させた。グルタチオン-セファロース4B (Amersham Biosciences)

を用いて融合タンパク質を精製し、そしてGST部分を、除去して、組換えRho GDIを生成した。タンパク質の純度は、SDS-PAGEによって決定し、そして濃度を測定した。ラットp75 ICDの欠失変異体は、配列番号17の残基274~342、残基274~351、残基274~363、残基274~375、残基274~390、残基274~406、残基274~425 (Liepinsh, E., Ilag, L. L., Otting, G. & Ibanez, C. F., EMBO J. 16, 4999-5005 (1997))。GST-p75変異体とRho GDIとの複合体形成を、GST-p75変異体の沈降によって評価した。

#### 【1004】

(GTP-RhoAのアフィニティー沈降)

アミノ末端でFLAGタグ化したヒトp75またはp75 ICDの欠失変異体を、pcDNA3.1発現プラスミドにクローニングし、そしてこれらを、293T細胞にトランスフェクトした。細胞を、50mM Tris (pH7.5)、1% Triton X-100、0.5% デオキシコール酸ナトリウム、0.1% SDS、500mM NaCl、10mM MgCl<sub>2</sub>、ならびに10μg/ml ロイペプチンおよび10μg/ml アプロチニン中に溶解した (Ren, X. D., Kiosses, W. B. & Schwartz, M. A., EMBO J. 18, 578-585 (1999))。細胞溶解物を、13,000g、4℃で10分間の遠心分離によって清澄化し、上清を、Rhotekinビーズ (Upstate Biotechnology) のGST-Rho結合ドメインの20μgを用いて、4℃にて45分間インキュベートした。このビーズを、洗浄緩衝液 (1% Triton X-100、150mM NaCl、10mM MgCl<sub>2</sub>、10μg/ml ロイペプチンおよび10μg/ml アプロチニンを含む、50mM Tris (pH7.5)) を用いて4回洗浄した。結合したRhoタンパク質を、RhoAに対するモノクローナル抗体 (Santa Cruz Biotechnology) を用いてウエスタンブロッティングによって検出した。

#### 【1005】

(インビトロヌクレオチド交換アッセイ)

脂質改変したRhoAを、記載されるように (Forget, M. A., Desrosiers, R. R., Gingras, D. & Beliveau, R., Biochem. J. 361, 243-54 (2002))、酵母の膜から精製した。Rho GDIと複合体化した [<sup>3</sup>H] GDP-RhoAまたはRho GDIと複合体化したGDP-RhoAを、以前に記載されるように (Takahashi, K. et al., J Biol Chem. 272, 23371-23375 (1997))、 [<sup>3</sup>H] GDPの存在下または非存在下でGDP-RhoAを最初にインキュベートし、続いてRho GDIと30分間インキュベートすることによって得た。ゲル濾過に供したサンプルを、5mM MgCl<sub>2</sub>、1mM ジチオトレイトールおよび0.1% CHAPSを含む20mM Tris-HCl (pH7.5) を用いて平衡化した。GDP解離およびGTP結合アッセイを、以前に記載されたように (Hart, M. J., Eva, A., Evans, T., Aaronson, S. A. & Cerione, R. A., Nature 354, 311-314 (1991))、フィルター結合方法によって実行した。 [<sup>3</sup>H] GDP解離アッセイにおいて、50nMの複合体を、30mM Tris-HCl (pH7.5)、5mM MgCl<sub>2</sub>もしくは0.5μM MgCl<sub>2</sub>、1mM EDTA (低濃度Mg)もしくは10mM EDTA (高濃度Mg)、0.1mM GTP、1mM ジチオトレイトール、0.12% CHAPS、ならびに0.2mg/ml ウシ血清アルブミンを含む反応混合物 (50μl) 中、種々の濃度のGST-融合タンパク質を用いて20分間インキュベートした。 [<sup>35</sup>S] GTPγS結合アッセイにおいて、1μM [<sup>35</sup>S] GTPγSを0.1mM GTPの代わりに使用した以外、複合体を上記のようにインキュベートした。示された時間において、反応サンプルのアリコートを、取り出し、ニトロセルロースフィルター (IPVH 000, Millipore) に通した。このフィルターを洗浄し、シンチレーションでのカウントに使用した。GSTタンパク質ま

たは緩衝液を、コントロールとして使用した。Hisタグ化したDb1の触媒ドメインを、90 nMの濃度で使用した。

#### 【1006】

(神経突起伸展アッセイ (インビトロ))

脊髄神経節を、成体マウスから取り出し、そして0.025% トリプシンおよび0.15% 1型コラゲナーゼ (Sigma) を用いた37℃で30分間のインキュベーションによって、単一細胞に分離させた。小脳ニューロンについて、2匹の動物由来の小脳を、5mlの0.025% トリプシン中で合わせ、粉碎し、そして37℃で10分間インキュベートした。10% FCSを含むDMEMを、添加し、細胞を800 rpmにて遠心分離した。ニューロンを、ポリ-L-リジンでコーティングしたチャンバスライド上のSato培地 (Cai, D., Shen, Y., De Bellard, M., Tang, S. & Filbin, M. T., Neuron 22, 89-101 (1999)) 中、プレートに播いた。伸展アッセイについて、プレートに播いた細胞を、24時間インキュベートし、そして4% (重量/容積) パラホルムアルデヒド中で固定し、そしてニューロン特異的 $\beta$ チューブリンIIIタンパク質を認識するモノクローナル抗体 (TuJ1) を用いて免疫染色した。次いで、最も長い神経突起の長さまたは各 $\beta$ チューブリンIII陽性ニューロンの総プロセスでの伸展を、決定した。示される場合、MAG-Fc (25  $\mu$ g/ml) またはNogoペプチド (4  $\mu$ M) を、プレートに播いた後、培地に添加した。pEF-BOS-myc-Rho GDIプラスミド (これは、Yoshimi Takai博士によって提供された) またはpEGFPプラスミドを、トランスフェクトのコントロールとして使用した。リポフェクションによるトランスフェクションの24時間後、細胞を再びプレートに播き、そして24時間インキュベートした。トランスフェクトされた細胞を決定するために、細胞を、透過処理し、そして抗myc抗体 (1:1000, Sigma) を用いて免疫染色した。

#### 【1007】

(サイレンサおよび/またはp75とRho GDIとの間の相互作用を破壊する因子の、哺乳動物における神経再生効果)

200gの雄のWistarラットを使用して、第9胸椎の椎弓切除術を行った後、脊髄の背側半分を切断した。持続浸透圧ポンプを用いて損傷部位へのTAT (PTDドメイン) 融合Pep5 (TAT-CFFRGGFFNHNPRYC) (配列番号2) またはTAT (PTDドメイン) 融合コントロールペプチド (TAT-GGWKWWPGIF) (配列番号15) のいずれかの持続的な投与を6週間 (1mg/体重/日) 行った。その際、ポンプに接続したチューブの先端を髄腔内に留置した。脊髄損傷後の機能回復の指標として、BBBスコアを使用し、損傷後7日、14日、21日、28日、35日、42日後に観察を行った。これらの実験は、Fournier A. E., Takizawa, B. T., Strittmatter, S. M., J. Neurosci. 2003, 23, 1416-1423に記載される技術を用いて行った。

#### 【1008】

同様の実験を、抗p75抗体、抗Rho GDI抗体、およびp75の細胞外ドメインを用いて実施したところ同様の神経再生効果が観察された。

#### 【1009】

これらの実験は、Fournier A. E., Takizawa, B. T., Strittmatter, S. M., J. Neurosci. 2003, 23, 1416-1423に記載される技術を用いて行った。

#### 【1010】

上述のように、

(実施例2-1: p75とRho GDIとの結合)

本発明者らはまず、RhoAとRho GDIとの複合体がp75の細胞内ドメインと会合するか否かを調べた。内因性にRho GDIを発現するがp75は発現しない293T細胞を、FLAGタグ化p75およびHAタグ化野生型RhoAを用いてトランスフ



エクトした。p75沈降物において、抗Rho GDI抗体によって、Rho GDIに対応するタンパク質の存在が明らかになった(図6a)。以前示されたように(Yamashita, T., Tucker, K. L. & Barde, Y. A., Neuron 24, 585-593 (1999))、RhoAは、複合体中に含まれていた。本発明者らは次に、この相互作用が、p75依存性機構を介してRhoAを活性化することが示されているMAGまたはNogoによって強化されるか否かを調べた。内因性のNogoレセプターを発現する(データには示さない)N1E-115細胞を、FLAGタグ化p75を用いてトランスフェクトした。Nogoの細胞外フラグメントの残基31~55に対応するペプチド(4 $\mu$ M)(Fournier, A. E., GrandPre, T. & Strittmatter, S. M., Nature 409, 341-346 (2001))および可溶性MAG-Fc(25 $\mu$ g/ml)は、p75とRho GDIおよびRhoAとの相互作用を有意に増強した(図6b)。対照的に、p75によってRhoAを不活性化するNGF(100ng/ml)は、p75とRho GDIおよびRhoAとの相互作用を破壊した。本発明者らは、以前に、内因性p75とRhoAとの相互作用がニューロン中で観察され得ないということに注目していた(Yamashita, T., Tucker, K. L. & Barde, Y. A., Neuron 24, 585-593 (1999))。従って、本発明者らは、マウス由来の生後小脳ニューロン(P9)から調製した溶解物を用いて、内因性p75とRho GDIおよびRhoAとの相互作用を調べた。図6cに示されるように、内因性p75とRhoAおよびRho GDIとの会合が、MAGまたはNogoを用いた刺激の後にのみ観察され、このことは、p75が、内因性p75を発現する細胞においてRhoAの構成性アクチベーターではあり得ないことを示唆する。これらの知見は、RhoAと複合体化したRho GDIが、p75と相互作用すること、そしてこの相互作用がMAGおよびNogoによって強化されることを実証する。

#### 【1011】

(実施例2-2: p75とRho GDIとの直接的相互作用)

RhoAが、酵母ツーハイブリッドスクリーニングによってp75相互作用タンパク質として単離されたので、RhoAは、p75に直接結合することが示唆された(Yamashita, T., Tucker, K. L. & Barde, Y. A., Neuron 24, 585-593 (1999))。しかし、酵母における内因性Rho GDIが哺乳動物Rhoファミリーのメンバーに対して活性であるという事実(Masuda, T. et al., J. Biol. Chem. 269, 19713-19718 (1994))は、酵母Rho GDIと複合体化したRhoAが酵母中のp75と会合し得るという代替的な可能性も議論の余地があるものとしている。従って、本発明者らは次に、精製組換えタンパク質を用いて、p75とRho GDIまたはRhoAとの直接的な物理的相互作用を調べた。GDP結合状態の細菌産生させたRhoA、GTP結合状態の細菌産生させたRhoA、またはヌクレオチド涵濁状態の細菌産生させたRhoAを、トランスフェクトした293T細胞から免疫沈降したp75と共にインキュベートした。しかし、本発明者らは、いかなるヌクレオチド状態においてもこれらの間の相互作用を観察しなかった(図7a)。興味深いことに、組換えRho GDIは、p75に結合した。プレニル化RhoAがRho GDIと複合体化した場合、このプレニル化RhoAはp75と会合し、このことは、RhoAではなくRho GDIが、p75と直接複合体化することを示唆する。

#### 【1012】

本発明者らは、Rho GDIとp75との間の相互作用の、構造的な基礎を決定した。p75の細胞内ドメイン(ICD)の6個の $\alpha$ ヘリックスのうちの5番目が、14マーのペプチドであるマストパランと有意な類似性を示す(Feinstein, D. L. & Larhammar, D., FEBS Lett. 272, 7-11 (1990))。マストパランは、RhoAを活性化することが公知の毒バチの両親媒性成分である(Koch, G., Haberman, B., Mohr, C., Just, I. & Aktor

ies, K., FEBS Lett. 291, 336-40 (1991))。p75 ICDの欠失変異体を用いた実験によって、この5番目のヘリックスがp75とRho GDIとの相互作用に必要であることが示された(図7b)。これらの結果は、MAGおよびNogoによるRhoAの活性化が、Rho GDIとp75 ICDの第5ヘリックスとの相互作用に依存し得ることを示唆する。この仮説をより直接的に試験するために、本発明者らは、内因性にp75を発現しない293T細胞を使用した。RhoAのGTP結合形態のアフィニティー沈降によって、以前に示されたように(Yamashita, T., Tucker, K. L. & Barde, Y. A., Neuron 24, 585-593 (1999))、RhoAが全長p75またはp75 ICDの過剰発現によって活性化されることが明らかになった。予想したように、この第5ヘリックスを欠く欠失変異体は、RhoAを活性化しなかった(図7c)。このことは、この第5ヘリックスがp75によるRhoAの活性化に必要であることを実証する。

#### 【1013】

(実施例2-3: Rho GDIからRhoAを離脱させる、p75の置換効果)

細菌によって発現させたp75を用いたインビトロアッセイでの実験によって、組換えRhoAに対するGDP/GTP交換活性は示されなかった(図8a)。これらの結果は、RhoAがp75と直接会合しないという事実と組み合わせると、p75がRho GDIの活性を低減し、ゆえに、Rho GDIからのRhoAの離脱を促進するという可能性を生じさせる。この工程は、グアニンヌクレオチド交換因子による活性化およびRhoタンパク質のGTP結合形態の膜会合を可能にする(Sasaki, T. & Takai, Y., Biochem Biophys Res Commun. 245, 641-645 (1998))。本発明者らはまず、低濃度 $Mg^{2+}$ においてRhoAのGDP/GTP交換反応を阻害するRho GDIの能力に対する、Rho GDIとp75のらせんドメイン(HD)との相互作用の効果を調べた。なぜなら、Rho GDIの阻害効果は、低濃度の $Mg^{2+}$ においてより明らかであるからである(Takahashi, K. et al., J Biol Chem. 272, 23371-23375 (1997))。この反応は、Rho GDIと複合体化した $[^3H]$  GDP-RhoAからの $[^3H]$  GDPの解離、ならびにRho GDIと複合体化したGDP-RhoAに対する $[^3S]$  GTP $\gamma$ Sの結合を測定することによって、概算した。p75 HDは、用量依存様式でRho GDI活性を低減した(図8b)。比較可能な条件下で、グルタチオンSトランスフェラーゼ(GST)は、Rho GDI活性に影響を与えなかった(図8b)。これらの結果は、p75 HDがRho GDIと直接相互作用して、RhoAのGDP/GTP交換反応を阻害するRho GDIの能力を低減させる能力を有することを実証する。本発明者らは次に、高濃度 $Mg^{2+}$ におけるRhoAのDb1刺激GDP/GTP交換反応を阻害するRho GDI能力に対する、p75 HDの効果を調べた。Rhoグアニンヌクレオチド交換因子(Rho GEF)(例えば、Db1)は、Rho GDI非存在下でGDP-RhoAのGDP/GTP交換反応を刺激するが、高濃度 $Mg^{2+}$ においてRho GDIと複合体化したGDP-RhoAのGDP/GTP交換反応は刺激しない(Yaku, H., Sasaki, T. & Takai, Y., Biochem Biophys Res Commun. 198, 811-817 (1994))。Db1は、GDP-RhoAからのGDPの解離を刺激した(図8a)が、Rho GDIと複合体化したGDP-RhoAからのGDPの解離は、顕著に低減された(図8c)。しかし、GDPの解離は、p75 HDによって回復した。Rho GDI活性に対するp75 HDの阻害効果は、用量依存的であった。p75 ICDは、p75 HDと同じ程度の阻害効果を示した(図3c)。これらの結果は、Rho GDIとp75 HDとの相互作用が、Rho GEF非依存性のRhoAのGDP/GTP交換反応およびRho GEF依存性のRhoAのGDP/GTP交換反応の両方で、Rho GDIの活性を増大させることを実証する。

#### 【1014】

p75はインビトロにおいてRho GDIからRhoAを離脱させる能力を有するの

で、p75を介したMAGおよびNogoによるRhoAの活性化は、Rho GDIからRhoを離脱させる活性に起因し得る。MAGならびにNogoペプチドは、生後小脳ニューロンからの神経突起伸展を有意に阻害したが、Rho GDIの過剰発現は、これらの阻害効果を破壊した(図8d)。これらの結果は、p75がRho GDI解離因子として作用するという本発明者らの示唆と一致する。

#### 【1015】

(実施例2-4: p75とRho GDIとの相互作用に対するペプチドリガンドの効果)

現在までに同定されている軸索再生のミエリン由来インヒビターの全ては、p75を介してニューロンに作用し、中枢神経系への損傷後のp75シグナル伝達の妨害は、軸索再生のミエリン依存性阻害を緩和し得る。Rho GDI会合の正確な領域を示すことによって、本発明者らは、p75の機能を特異的に阻害する戦略を開発することが可能となった。p75 HDへの特異的なペプチドリガンドは、以前コンビナトリアルライブラリーから得られた(Ilag, L. L. et al., Biochem Biophys Res Commun. 255, 104-109 (1999))。このリガンドは、15アミノ酸残基のペプチド(Pep5; CFFRGGFFNHNPRYC(配列番号2))であり、そして結合部位は、核磁気共鳴分光法によって、ヘリックス5およびヘリックス6によって組み立てられる疎水性断片上にマッピングされた。しかし、このペプチド配列が哺乳動物中に存在するタンパク質であるということは示唆されなかった。本発明者らは、このペプチドがRho GDIのp75 HDに対するリクルートメントを破壊するサイレンサとしての役割を果たし得るという可能性に興味を持ち、そして驚くべきことに、実際にこのペプチドがサイレンサとして機能し得ることを実証した。本発明者らはまず、p75がPep5と会合するか否かを確認した。Pep5を含有するグルタチオンSトランスフェラーゼ融合タンパク質(GST-Pep5)を、p75を豊富に発現する生後小脳由来から調製した溶解物と共にインキュベートした。GST-Pep5沈降物において、抗p75抗体によって、p75に対応するタンパク質の存在が明らかになった(図9a)。次いで、結合親和性をPep5とRho GDI、p75との間で比較した。トランスフェクトした293T細胞の溶解物を免疫沈降し、精製したp75を、1 $\mu$ M GST-Rho GDIおよび示された濃度のPep5と共にインキュベートした(図9b)。Pep5は、p75とRho GDIとの会合を用量依存的に阻害したが、コントロールペプチドは阻害しなかった。従って、Pep5は、インビトロにおいてp75によって媒介されるシグナルを破壊する能力を有する。このペプチドリガンドは、インビボにおいてp75 HDに対して直接的に作用する場合、細胞への侵入を増大させなければならないので、本発明者らは、ヒト免疫不全ウイルスタンパク質からのアミノ末端11アミノ酸タンパク質導入ドメイン(PTDドメイン)と融合させたPep5(TAT-Pep5)を作製した(Schwarze, S. R., Ho, A., Vocero-Akbani, A. & Dowdy, S. F., Science 285, 1569-1572 (1999))。解離小脳ニューロンにおけるMAG-Fcによって誘導されるp75とRho GDIとの相互作用は、競合様式でTAT-Pep5によって有意に阻害されたが、TAT(PTDドメイン)融合コントロールペプチドによって阻害されなかった(図9c)。従って、Pep5は、p75とのRho GDI会合のインヒビターとして使用され得る。

#### 【1016】

同様の結果が、抗p75抗体、抗Rho GDI抗体、およびp75の細胞外ドメインを用いて実施した場合にも観察された。

#### 【1017】

(実施例2-5: Pep5によるミエリンシグナルのサイレント化)

本発明者らが次に取り組んだ問題は、Pep5がMAGまたはNogoの効果を阻害するか否かということである。本発明者らは、MAGまたはNogoの効果を測定するために神経突起成長アッセイを使用した。本発明者らは、配列番号4の残基368~381に対応するラットp75由来の別のコントロールペプチドを使用した。このペプチドは、1

00 nM (図10b) または10  $\mu$ M (データには示さない) の濃度において、脊髄神経節 (DRG) ニューロンの神経突起伸展に影響を与えず、そしてMAG-Fcの作用にも (図10b) Nogopeプチドの作用にも (データには示さない) 影響を与えなかった。しかし、100 nMの濃度で培養ニューロンに外因的に添加されたTAT-Pep5は、MAG (25  $\mu$ g/ml) ならびにNogopeプチド (4  $\mu$ M) に対する応答性を破壊した (図10a、b)。生後小脳ニューロンを使用して、Pep5の効果を調べた。DRGニューロンにおいて観察されたように、TAT-Pep5は、MAG (25  $\mu$ g/ml) およびNogopeプチド (4  $\mu$ M) の阻害効果を効果的にサイレント化した (図10c、d)。最後に、このペプチドがp75シグナル伝達のサイレンサとして作用することをより明確に示すために、本発明者らは、アフィニティー免疫沈降によってRho活性を測定した。予想したように、RhoAは、MAG-FcまたはNogopeプチドの生後小脳ニューロンへの添加30分後に活性化されたが、TAT-Pep5は、これらの細胞に対するMAG-FcまたはNogopeプチドによって誘導されるRhoAの活性化を阻害した (図10e)。これらの知見は、Pep5がRho GDIとp75との会合を阻害することによって、p75を介したRhoAの活性化を阻害することを、強く示唆する。

#### 【1018】

同様の結果が、抗p75抗体、抗Rho GDI抗体、およびp75の細胞外ドメインを用いて実施した場合にも観察された。

#### 【1019】

(実施例2-6: サイレンサおよび/またはp75とRho GDIとの間の相互作用を破壊する因子の、インビボにおける神経再生効果)

200gの雄のWistarラットを使用して、第9胸椎の椎弓切除術を行った後、脊髄の背側半分を切断した。持続浸透圧ポンプを用いて損傷部位へのTAT融合Pep5またはTAT (PTDドメイン) 融合コントロールペプチドのいずれかの持続的な投与を行った。その結果、コントロールペプチドの場合と比較して、TAT-Pep5を用いた場合に顕著な神経再生が観察された。

#### 【1020】

同様の結果が、抗p75抗体を用いて実施した場合にも観察された。

#### 【1021】

(実施例2-7: マウスにおける実証)

上記と同様の実験をマウスを用いて行ったところ、同様に、TAT融合Pep5および抗p75抗体を用いた場合に、神経の再生が確認された。

#### 【1022】

(実施例2-8: 改変アミノ酸)

同様の実験をPep5の配列 (配列番号2) のC末端にアラニンを付加したもの、p75の細胞外ドメインに対する抗体、配列番号4の273-427位のうち、423位のアラニンをバリンに変更したもので行ったところ、同様に、神経の再生が確認された。

#### 【1023】

(実施例2-9: 他の因子)

同様の実験を、Pep5ポリペプチドをコードする核酸分子、p75ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子としての抗体、p75ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子としてのアンチセンスおよびRNAi、p75細胞外ドメインポリペプチド、p75細胞外ドメインポリペプチドをコードする核酸分子、MAGポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子としての抗体を用いた場合でも同様にインビトロで神経突起が伸長することが観察され、かつ、インビボで神経が再生することが観察された。

#### 【1024】

神経に関連する疾患、障害および状態は、特に成体において再生が困難であるという特殊事情から、その治療についても根本的な治療が困難といわれてきた。しかし、本発明の上述のような効果によって、従来では不可能とされていた診断が可能となり、治療にも応

用することができることが明らかとなった。したがって、本発明は、従来の診断薬でも医薬でも達成不可能であった有用性を有するといえる。

**【1025】**

(実施例3: p75に対する中和抗体は、損傷CNSにおいて軸索再生を促進する)  
p75を中心としたシグナル伝達経路をさらに詳細に調べるために、本発明者らは、p75に対する抗体がこの経路に与える影響について分析した。

**【1026】**

(材料および方法)

本質的に、実施例1および実施例2と同様の材料および方法で実施した。

**【1027】**

(実施例3-1: 抗p75抗体は、ミエリン結合インヒビターに対する有望な薬剤である)

本発明者らは、神経突起成長アッセイを用いて、MAG、Nog oおよびミエリンの効果を測定した。MAG-Fc ( $25 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) およびミエリン、ならびにNog oペプチド ( $4 \mu\text{M}$ ) (Nog oの細胞外フラグメントの残基31~55に対応する; Fournier, A. E. ら, Nature 409, 341-346, 2001) は、生後小脳ニューロンからの神経突起伸展を有意に阻害した(図11a)。p75のドミナントネガティブ形態として作用することが予想される、Fcに融合した組換えp75細胞外ドメインは、Nog o阻害効果を部分的に阻害し、一方、p75へのNGFの結合をブロックするために使用され得るp75の細胞外ドメインに対するポリクローナル抗体(AB1554, Chemicon) は、神経突起阻害効果を有意に軽減した(図11a)。抗体自体は、神経突起伸展に何の効果も有さなかった。この作用は、p75のシグナル伝達の阻害によって媒介される。なぜなら、Nog oペプチドによるRhoAの活性化は、この抗体によって破壊されたからである(図11b)。この抗体の阻害効果は、p75とNog oレセプターとの会合を阻害することに依存し得る。なぜなら、カエルp75に対する抗体を用いて以前に示されたように(Wong, S. T. ら, Nat. Neurosci. 5, 1302-1308, 2002)、Nog oレセプターとp75との相互作用が、この抗体によって低減されたからである(図11c)。これらの結果は、この抗体がミエリン結合インヒビターに対する有望な薬剤であることを示す。

**【1028】**

(実施例3-2: 抗p75抗体は、損傷CNSにおいて軸索再生を促進する)

本発明者らは次に、成体マウスにおいて、胸部レベルT10/T11での背側の半側切断損傷後、皮質脊髄路(CST)線維の再生を促進する抗体の能力を試験した。抗p75抗体またはコントロール抗体を、その損傷部位の上に配置したカテーテルを用いて浸透圧ミニポンプ(Alzet 1002, Durect Corp., Cupertino, CA; 2週間にわたって1時間あたり $0.25 \mu\text{l}$ での、 $100 \mu\text{l}$ 溶液)を介して送達した。CSTを、運動皮質への順行性ニューロントレーサBDAの注射によって、順行性に標識した(Fournier, A. E. ら, J. Neurosci. 23, 1416-1423, 2003)。損傷後、運動機能の回復を、改変BBBスケール(Dergham, P., Ellezam, B., Essagian, C., Avedissian, H., Lubell, W. D. & McKerracher, L., J. Neurosci. 22, 6570-6577 (2002))を用いて評価した。レベルT10/T11にて背側の半側切断を受けた動物は、最終的に、改変BBBスケールによって評価されるように、部分的な機能回復を得た(図12a)。抗p75抗体で処理したマウスの機能回復は、損傷後の7日目~4週間にかけて、コントロール抗体で処理したマウスの機能回復よりも有意に高かった。抗p75抗体で処理したマウスにおいて、損傷部位に対して2mm尾方の横断面は、脊髄の背側半分において再生している軸索の数の増加を示した(図12b)。再生している軸索の数は、脊髄の背側半分において二倍に増加した(図12c)

(実施例3-3: 他の因子)

同様の実験を、Pep5ポリペプチド、Pep5ポリペプチドをコードする核酸分子、

p75ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子としての抗体、p75ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子としてのアンチセンスおよびRNAi、p75細胞外ドメインポリペプチド、p75細胞外ドメインポリペプチドをコードする核酸分子、MAGポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子としての抗体、MAGポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子としてのアンチセンスおよびRNAiを用いた場合でも同様に、インビボで神経が再生し、脊髄機能が回復することが観察された。

#### 【1029】

(実施例4:細胞質p21は、Rhoキナーゼ活性を阻害することによって、神経突起リモデリングを調節する)

活性な神経発生期間の間に、いくつかの神経芽細胞は、有糸分裂後状態に入り、次いで、それらの最終到達点に移動し始める。胚性ヒヨコ網膜において、神経節細胞は、胚5日目(E5)辺りで活性に生成される(Frade, J. M., Development 124:3313-3320, 1997)。本発明者らは、これらの細胞におけるp21の発現を調べ、p21がこれらの細胞の分化および形態形成に関与するか否かを試験した。

#### 【1030】

(材料および方法)

(ヒヨコ網膜およびヒヨコ網膜細胞の調製)

ヒヨコE5胚全体(White Leghorn)を、PBS中の4%パラホルムアルデヒドで一晩固定し、30%スクロースに浸した。網膜の細胞切片(厚み30 $\mu$ m)を、前頭面で切断し、スライドガラス上で溶かしてマウントし、室温で乾燥させた。網膜ニューロン培養に関して、E5胚からの網膜を、色素上皮から切開して遊離させ、そして以前に記載されるように(Rodriguez-Tebar, A. ら, Dev. Biol. 136:296-303, 1989; de la Rosa, E. J. ら, Neuroscience. 58:347-352, 1994)解離させた。解離させた細胞を、4ウェルチャンバースライド(Nalge Nunc International K. K.)上でプレートに播いた(20,000細胞/cm<sup>2</sup>)。このプレートは、ポリ-L-オルニチン/ラミニン(Sigma-Aldrich)を用いて事前にコーティングしておいた(Collins, F., Dev. Biol. 65:50-57, 1978)。細胞を、N2補充物を含むDME/F12混合物(1:1)中で培養し(Bottenstein, J. E. およびG. H. Sato, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76:514-517, 1979)、5%CO<sub>2</sub>を含む水飽和雰囲気中37℃にて12時間維持し、そしてPBS中の4%パラホルムアルデヒドで固定した。

#### 【1031】

(プラスミド構築)

pEGFP-full-p21(aa1~164)(配列番号23)およびpEGFP- $\Delta$ NLS-p21(配列番号23のaa1~140)は、GFP融合タンパク質の哺乳動物発現ベクターである(Asada, M. ら, EMBO J. 18:1223-1234, 1999)。pEF-BOS中のMyc-Rho-キナーゼは、K. Kaibuchi博士(Nagoya University, Nagoya, Japan)によって供与された。

#### 【1032】

(細胞培養およびトランスフェクション)

NIH3T3細胞、N1E-115細胞、および293T細胞を、10%胎仔ウシ血清を含むDME中で維持した。Lipofectamine 2000(Invitrogen)をトランスフェクションに使用した。張線維形成アッセイに関して、NIH3T3細胞をトランスフェクション後、血清不含培地中で16時間培養した。張線維形成を、この細胞を10%血清と10分間インキュベートすることによって引き起こした。海馬ニューロンを、以前に記載されたように(Neumann, H. ら, Science. 26

9:549-552, 1995)、18日齢のSprague-Dawleyラットから調製した。簡単に言うと、海馬を切開し、髄膜を取り出した。切り取った組織を、粉砕によって解離させた。解離した細胞をポリ-L-リジン (Sigma-Aldrich) で予めコーティングしたディッシュにプレートし、10% 胎仔ウシ血清を含むDME中で24時間培養した。次いで、培地をB27 (Invitrogen) を補充したDMEと置換し、そしてこれらの細胞をGFPまたはGFP- $\Delta$ NLS-p21でトランスフェクトした。ニューロン形態をトランスフェクトの24時間後に評価した。

#### 【1033】

(N1E-115細胞の形態学的分析)

N1E-115細胞を、GFP、GFP-full-p21またはGFP- $\Delta$ NLS-p21でトランスフェクトし、そして血清飢餓状態で5時間培養した。次いで、培地を、10%胎仔ウシ血清を含むDMEと置換した。細胞を、トランスフェクションの48時間後に固定した。細胞の形態を、3つの群に分類した；神経突起ポジティブ細胞、丸型細胞、および他の細胞。細胞体よりも長い神経突起を有する細胞を、神経突起ポジティブ細胞と規定した。他の細胞は、種々の特徴（微小な棘状の外見、波立った外見、および平らな外見など）を有した。

#### 【1034】

( $\Delta$ NLS-p21およびRhoキナーゼの同時免疫沈降)

293T細胞を、GFP-full-p21またはGFP- $\Delta$ NLS-p21と組合わせたmyc-Rhoキナーゼでトランスフェクトした。トランスフェクションの48時間後、細胞を、1mlの溶解緩衝液 (50mM Tris-HCl (pH7.5)、150mM NaCl、10% グリセロール、0.5% Nonidet-P40、ならびにプロテアーゼインヒビターカクテルの錠剤；Roche) を用いて溶解した。細胞溶解物を、13,000gで20分間遠心分離し、上清を収集した。免疫沈降を、抗p21マウスモノクローナル抗体 (Santa Cruz Biotechnology) および0.75mlの上清を用いて、4℃で2時間実行した。免疫複合体をプロテインG-Sepharose (Amersham Pharmacia Biotech) のスラリー (50% vol/vol) を用いて収集し、溶解緩衝液で4回洗浄し、そしてSDS-PAGEに供した。これを二フッ化ポリビニリデンメンブランに転写し、抗mycウサギポリクローナル抗体 (Santa Cruz Biotechnology) を用いてプロットした。N1E-115細胞中の内因性タンパク質の相互作用を、抗Rhoキナーゼ抗体を用いて同様に評価した。

#### 【1035】

(インビトロ結合アッセイ)

組換え全長p21 (配列番号23の1~164、98%より高い純度、1nM；Santa Cruz Biotechnology) およびRhoキナーゼフラグメントの精製GST融合タンパク質 (GST-CAT; aa 6~553) を、1mlの緩衝液 (50mM Tris-HCl (pH7.5)、150mM NaCl、5mM MgCl<sub>2</sub>、1mM DTT、および1mM EDTA、ならびにプロテアーゼインヒビターカクテルの錠剤) 中で2時間インキュベートし、そしてGST-CATをグルタチオンセファロース (Amersham Pharmacia Biotech) を用いて沈降した。生じる沈降物を、10% ゲルを用いたSDS/PAGE後に、二フッ化ポリビニリデンメンブランに電気的に転写し、そして、抗p21抗体を用いて免疫プロットした。

#### 【1036】

(キナーゼアッセイ)

Rhoキナーゼに関するキナーゼ反応を、S6キナーゼアッセイキット (Upstate Biotechnology) を用いて製造業者に指示書に従って実行した。簡単に言うと、インビトロアッセイに関して、10 $\mu$ lのアッセイ希釈緩衝液 (ADB: 20mM MOPS (pH7.2)、25mM  $\beta$ -グリセロールホスフェート、5mM EGTA、1mM オルトバナジウム酸ナトリウム、および1mM ジチオスレイトール)、

10  $\mu$ lの基質カクテル (250  $\mu$ M ADB中の基質ペプチド [AKRRRLSSLRA] (配列番号24))、10  $\mu$ lのインヒビターカクテル、10  $\mu$ lの [ $\gamma$ - $^{32}$ P] ATP混合物 ([ $\gamma$ - $^{32}$ P] ATPの10  $\mu$ Ciを含む、マグネシウム/ATPカクテル)、および20mUのRhoキナーゼフラグメント (aa 1~543; Upstate Biotechnology) を混合した。p21と共に30℃で10分間インキュベートした後、反応混合物を、P81ホスホセルロースペーパーにスポットし、シンチレーションカウンターを用いて定量した。

#### 【1037】

インビボアッセイに関して、293T細胞を、GFPまたはp21構築物と組合わせたmyc-Rhoキナーゼで同時トランスフェクトした。細胞を、溶解緩衝液 (50mM Tris-HCl (pH7.5)、150mM NaCl、10% グリセロール、1% Nonidet-P40およびプロテアーゼインヒビターカクテル) を用いて溶解した。キナーゼアッセイを、この溶解物を用いて実行した。

#### 【1038】

##### (免疫染色)

免疫組織化学に関して、ヒヨコ網膜の切片を、透過処理し、ブロッキング緩衝液 (PBS中の、0.1% Triton X-100、0.1% BSA、および5% ヤギ血清) を用いて室温で30分間ブロッキングした。免疫細胞化学に関して、細胞を、透過処理し、そして0.2% Triton X-100を含む緩衝液を用いてブロッキングした。これを抗p21抗体 (1:1000) および抗 $\beta$ -チューブリンクラスIIIウサギポリクローナル抗体 (TuJ1) (1:2,000; Research Diagnostic, Inc.) を用いて4℃で一晩インキュベートし、次いで、Alexa 488標識ヤギ抗マウスIgG抗体 (Molecular Probes) およびAlexa 568標識ヤギ抗ウサギIgG抗体 (Molecular Probes) を用いて1時間インキュベートした。テトラメチルローダミンイソチオシアネート標識したファロイジン (1:1,000; Sigma-Aldrich) を用いて、NIH3T3細胞およびN1E-115細胞中のF-アクチンを検出した。海馬ニューロンを、抗TuJ1抗体を用いて免疫染色した。必要である場合、DAPI (300nM; Wako) を用いて核を染色した。サンプルを、共焦点レーザー走査顕微鏡 (Carl Zeiss) 下で調べた。

#### 【1039】

(実施例4-1: E5胚由来のヒヨコ網膜ニューロンは、細胞質p21発現を示す)

免疫組織化学を用いて、神経発生直後の網膜ニューロンが、深い層に移動することが見出された (図13A)。細胞中のp21免疫反応性を、中枢神経網膜の硝子表面において、p21に対するモノクローナル抗体を用いて検出した (図13A)。p21ポジティブ細胞は、移動前の未成熟な網膜ニューロンであった。従って、p21は、インビボにおいて網膜前駆体細胞の分化に関与することが示唆される。

#### 【1040】

次に、本発明者らは、p21の細胞レベル下での局在をより正確に評価するために、E5網膜から神経前駆体細胞を単離した。ラミニン-1上で培養した分離網膜細胞は、神経突起を急速に伸長した (Frade, J. M. ら、Exp. Cell. Res. 222: 140-149, 1996b)。細胞を、1  $\mu$ M インスリンを含む化学的に規定された培地中で、ラミニン-1上で培養した。マイクロモル濃度の範囲で使用したインスリンは、おそらく、インスリン様増殖因子-Iレセプターに対して作用し、ゆえに、E5網膜細胞上でインスリン様増殖因子-Iの分化効果を模倣する (Frade, J. M. ら、Development. 122: 2497-2506, 1996a)。 $\beta$ -チューブリンに対する免疫反応性を欠く未成熟細胞のほぼ全てにおいて、p21の発現は、核の中で優先的に見出された (図13B)。核中のp21は、これらの細胞中の細胞周期における変化に寄与し得る。一方、ニューロン特異的 $\beta$ -チューブリンに対する免疫反応性を有する、相対的に長い神経突起を有するほとんどのニューロンにおいて、p21は、主に細胞質に



局在した(図13B)。これらの知見は、p21の細胞質発現が、新生ニューロン中で誘導されることを示唆する。

#### 【1041】

(実施例4-2: N1E-115細胞のインビトロ分化は、細胞質におけるp21発現と関連する)

本発明者らは次に、ニューロン分化がp21の細胞質発現と関連するか否かを調べるために、神経芽細胞であるN1E-115細胞を使用した。DMSOによって分化が誘導されるN1E-115細胞を、抗p21抗体を用いて免疫染色した。DMSO処理の24時間後、p21は、核に誘導された(図14B)。しかし、4日後(この時点で、過剰な神経突起生成が十分に明らかであった)、p21は、細胞質に主に局在した(図14C)。この点に関して、p21の分化関連細胞質発現は、ヒヨコ網膜前駆体細胞に限定されない。

#### 【1042】

(実施例4-3: p21の異所性発現は、N1E-115細胞の形態に影響を与える)

p21を細胞質で発現する細胞が長い神経突起を伸長し、そして細胞質p21を欠く細胞が長い神経突起を伸長しなかった(図13および14)、本発明者らは、細胞質p21が神経突起伸長と関連するという仮説をたてた。従って、本発明者らは次に、細胞質へのp21の再局在が神経突起の伸長を誘発するか否かを調べた。この問題に取り組むために、核局在シグナルを欠くp21( $\Delta$ NLS-p21; aa 1~140)の哺乳動物発現ベクターならびに全長p21(full-p21; aa 1~164)の哺乳動物発現ベクターを作製した(Asada, M. ら, EMBO J. 18:1223-1234, 1999)。 $\Delta$ NLS-p21またはGFPでトランスフェクトした細胞は、トランスフェクションの48時間後まで増殖した(図15A)が、full-p21を用いた細胞は、増殖を停止した。full-p21を用いてトランスフェクトした細胞またはDMSO処理した細胞において、サイクリンD3のタンパク質(Kranenburg, O. ら, J. Cell. Biol. 131:227-234, 1995)のレベルは、非常に増大し、一方、 $\Delta$ NLS-p21を用いた細胞において、発現の変化は見出されなかった(図15B)。さらに、不十分な(underphosphorylated)リン酸化状態のpRb(網膜芽細胞腫遺伝子産物)が、誘導され、そして過剰にリン酸化されたpRbが、DMSO処理によって検出不能になり、過剰にリン酸化されたpRbは、観察した期間の間、 $\Delta$ NLS-p21をトランスフェクトした細胞において優勢なままであった(図15B)。これらのデータは、U937細胞において示されたように(Asada, M. ら, EMBO J. 18:1223-1234, 1999)、 $\Delta$ NLS-p21が、N1E-115細胞において分化誘導活性を有さないことを実証する。従って、これらのことから、本発明者らは、細胞に対する分化効果を考慮することなく、p21の効果を評価することができた。N1E-115細胞における $\Delta$ NLS-p21の発現レベルは、DMSO処理4日後の細胞中の内因性p21の発現レベルと匹敵した(図15C)。N1E-115細胞を、これらの構築物を用いてトランスフェクトし、そして形態学的変化を、48時間後に評価した。全長p21発現を伴う細胞は、GFP発現細胞またはトランスフェクションしていない細胞と比較して、いくらか平らかつ拡大された様子を示し、細胞の丸みが少なくなり(図15D)、一方で、長い神経突起を有する細胞集団は増加しなかった(図15E)。これらの変化は、核の中でp21を発現するN1E-115細胞の分化によって引き起こされ得(Kranenburg, O. ら, J. Cell. Biol. 131:227-234, 1995)、本発明者らは、細胞をDMSO処理によって分化させた(Kimhi, Y. ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 73:462-466, 1976)場合に、類似の表現型を観察した。全長p21発現を伴う細胞は、4日後に長い神経突起を伸長し、この時点で、p21に対するシグナルもまた、細胞質において見出された。一方、 $\Delta$ NLS-p21を用いてトランスフェクトされた細胞の45%より多くが、長い神経突起を伸長した(コントロールと比較して、3.1倍の増加; 図15E)。これらの結果は、細胞質p21がN1E-115細胞において神経突起

のリモデリングを調節することを示唆する。

【1043】

(実施例4-4:細胞骨格機構に対する、細胞質p21の効果)

RhoAのドミナントネガティブ変異体またはp160ROCK (Rhoキナーゼのアイソフォーム) の過剰発現は、N1E-115細胞の細胞の丸まりを誘導した(Hirose, M. ら, J. Cell. Biol. 141:1625-1636, 1998) が、p160ROCKのドミナントネガティブ変異体の発現またはY-27632 (Rhoキナーゼの特定の阻害活性を有する化合物 (Uehata, M. ら, Nature 389:990-994, 1997) での処理(図15E)は、有意な神経突起形成を誘導した(Hirose, M. ら, J. Cell. Biol. 141:1625-1636, 1998)。N1E-115細胞における本発明者らの知見は、これらの以前の報告と組合わせて、細胞質p21の神経突起促進活性が、Rho/Rhoキナーゼと関連し得ることを示唆する。従って、本発明者らは、p21がRhoによって媒介されるアクチン細胞骨格を調節するか否かを調べるために、NIH3T3細胞を次に使用した。NIH3T3細胞を、 $\Delta$ NLS-p21でトランスフェクトし、次いで、16時間血清を飢餓させる。血清を用いた10時間のインキュベーションによって、アクチン張線維の形成が、好ましくはRhoの活性化を通して誘導された(Ridley, A. J. およびA. Hall, Cell 70:389-399, 1992)。しかし、 $\Delta$ NLS-p21でトランスフェクトされたNIH3T3細胞は、血清添加後にほとんど張線維を形成せず、一方、顕著な張線維が非トランスフェクト細胞中で見出された(図16、AおよびB)。広範囲なアクチン張線維が、全長p21発現を用いた細胞中で観察された。これらの結果は、NIH3T3細胞におけるRho誘導性アクチン再編成が、p21の細胞質発現によってブロックされ得ることを示唆する。

【1044】

(実施例4-5: p21は、細胞質においてRhoキナーゼに結合する)

Rhoキナーゼは、線維芽細胞においてmDialと共に作用して、Rho誘導性表現型を誘発することが示された(Watanabe, N. ら, Nat. Cell Biol. 1:136-143, 1999)。血清は、Rhoの最も強力なアクチベーターのうちの1つであるので(Ridley, A. J. およびA. Hall, Cell 70:389-399, 1992)、血清刺激細胞における細胞質p21の発現による張線維形成の損失は、Rhoの下流経路の妨害から生じ得る。 $\Delta$ NLS-p21の発現によるN1E-115細胞の形態学的変化は、Y-27632によるものと匹敵した(図15E)。p21が、アポトーシスシグナル調節キナーゼ1の活性(Asada, M. ら, EMBO J. 18:1223-1234, 1999) およびセリントレオニンキナーゼであるサイクリン-Cdkキナーゼの活性(総説に関して、Pines, J., Biochem. J. 308:697-711, 1995を参照のこと)を阻害することを考慮して、本発明者らは、p21がRhoキナーゼ(これはまた、セリントレオニンキナーゼでもある)の活性を阻害し得ると推測した。細胞質p21が、細胞質中でRhoキナーゼと複合体を形成する可能性を試験するために、同時免疫沈降研究を、GFP- $\Delta$ NLS-p21およびmycタグ化Rhoキナーゼで同時トランスフェクトをした293T細胞を用いて実行した。細胞質発現は、GFP- $\Delta$ NLS-p21を用いてトランスフェクトした293T細胞中で十分に明らかであった(図17A)。溶解物を、抗p21抗体を用いて免疫沈降した場合、p21は、mycタグ化Rhoキナーゼを効率的に沈降した(図17B)。次いで、 $\Delta$ NLS-p21とRhoキナーゼとの相互作用がその細胞局在に依存するか否かを試験する試みにおいて、本発明者らは、RhoキナーゼとGFP-full-p21(これは、核に優先的に発現する)との相互作用を試験した(図17A)。293T細胞におけるp21の全長形態と短縮形態との比較可能な発現にも関わらず、 $\Delta$ NLS-p21と対照的に、かすかなシグナルのみが検出され得た(図17B)。

【1045】

人工的に過剰発現するタンパク質の相互作用を天然の細胞中で検出することは困難であ

り得る。抗p21抗体を用いて、本発明者らは、分化N1E-115細胞から調製した溶解物を用いて、内因性タンパク質の相互作用を調べた。N1E-115細胞は、DMSOでの処理後3日～4日で、細胞質中にp21を発現した(図14)。p21免疫沈降物において、抗Rhoキナーゼ抗体によって、Rhoキナーゼに対応するタンパク質の存在が明らかになった(図17C)。

#### 【1046】

全長p21とRhoキナーゼとの相互作用の欠如は、細胞中の局在化の差異に起因し得る。従って、本発明者らは、組換え全長p21とRhoキナーゼとのインビトロ相互作用を試験した。これらのタンパク質は、インビトロで互いに結合した(図17D)。本明細書中に使用されるRhoキナーゼのフラグメントに対する融合されたGST(GAT-CAT; aa 6～553)は、Rhoキナーゼの触媒領域に対応するので、p21は、Rhoキナーゼの触媒領域に直接結合し得る。これは、S6キナーゼ基質ペプチド(AKRRLSSSLRA)ならびにY-27632が、p21とRhoキナーゼとの相互作用を用量依存的に阻害したという本明細書中に示す知見を実証する(図17D)。これらの結果は、p21が細胞質においてRhoキナーゼと会合することを示唆する。

#### 【1047】

(実施例4-6: p21は、Rhoキナーゼ活性を阻害する)

本発明者らは次に、p21がインビトロにおいてRhoキナーゼの活性を阻害し得るか否かを調べた。キナーゼアッセイは、S6キナーゼ基質ペプチドおよび $[\gamma\text{-}^3\text{ }^2\text{P}]\text{ATP}$ を用いて実行した。シンチレーションカウンタを使用することによって、ホスホセルロースペーパー上の $^3\text{ }^2\text{P}$ -標識基質ペプチドの量を、決定した。この動的分析によって、p21が、用量依存様式でS6キナーゼ基質ペプチドに対するRhoキナーゼ活性を阻害することが明らかとなり(図18A)、そしてIC<sub>50</sub>値は、1.43 nMと概算された。

#### 【1048】

これらの結果に基づき、Rhoキナーゼ活性が、インビボにおいて $\Delta\text{NLS-p21}$ の発現によって阻害されるか否かを本発明者らは調べた。293T細胞を、 $\Delta\text{NLS-p21}$ の存在下または非存在下でmyc-Rhoキナーゼを用いてトランスフェクトした。キナーゼアッセイは、インビトロアッセイと同じ方法で細胞由来の溶解物を用いて実行した。その結果によって、Rhoキナーゼ活性は、コントロールと比較して、 $\Delta\text{NLS-p21}$ を発現する細胞において阻害されてもとの平均48.1%となったことが示された(図18B)。この阻害効果は、Y-27632の効果(阻害されてもとの平均51.9%になった)に匹敵するが、全長p21の発現は、有意な効果を有さなかった。本発明者らのデータは、Rhoキナーゼ活性が、インビボおよびインビトロにおいてp21によって阻害されることを明確に実証する。

#### 【1049】

(実施例4-7: 細胞質p21は、海馬ニューロンにおいて神経突起の伸展および分枝を促進する)

細胞質p21がRhoキナーゼに対して作用するという本発明者らの知見の妥当性を調べるために、本発明者らは、ニューロンに対する効果を評価した。ラットE18胚由来の海馬ニューロンの培養物を使用した。このニューロンは抗p21抗体を用いた免疫細胞化学によって検出されるに十分な内因性p21を発現しなかったため、本発明者らはこのニューロンを選択した。分離した海馬ニューロンを、48時間インキュベートし、そして $\Delta\text{NLS-p21}$ を用いてトランスフェクトした。トランスフェクションの24時間後、細胞を固定し、 $\beta$ -チューブリンIIIを用いて免疫標識した。1ニューロンあたりの総神経突起長、軸索長(1ニューロンあたりの最も長い神経突起の長さとして規定)、ニューロン体由来する一次突起物の数、および1ニューロンあたりの分枝点の数を決定した(Neumann, H. ら, J. Neurosci. 22: 854-862, 2002)。 $\Delta\text{NLS-p21}$ を発現する細胞のニューロン形態は、トランスフェクションしていないコントロール細胞またはGFPを発現するコントロール細胞とは明らかに異なった(図1

9A)。ΔNLS-p21発現を伴う細胞は、コントロール細胞（GFPを発現する細胞、またはトランスフェクションしていない細胞）よりも、より長い神経突起を伸長し、そしてより多くの分枝点を有した。ΔNLS-p21の異所性発現は、ニューロンあたりの総神経突起長を135.9 μm (±7.2 μm SEM) から307.2 μm (±34.0 μm SEM) に増大し、軸索長を66.3 μm (±3.2 μm SEM) から162.9 μm (±18.6 μm SEM) に増大し、1ニューロンあたりの分枝点の数を1.3 (±0.2 SEM) から2.6 (±0.3 SEM) に増大した。しかし、一次突起物の数における変化は、細胞質p21の過剰発現によって見出されなかった（図19B）。これらの結果は、細胞質p21が、胚性海馬ニューロン中で神経突起リモデリングを調節することを示す。

#### 【1050】

（実施例4-8：TAT結合p21の効果）

p21を、200gの雄性Wistar系ラットを用いて、神経再生実験を行ったところ、その効果が十分に見られなかった。

#### 【1051】

そこで、本発明者らは、p21にTAT PTDドメインを結合させた分子を作製し、その効果を調べた。

#### 【1052】

まず、p21をコードする核酸配列に、GSTをコードする核酸配列およびヒト免疫不全ウイルスタンパク質からのアミノ末端11アミノ酸タンパク質導入ドメイン（YGRKKRRQRRR）（配列番号20）をコードする核酸配列およびmycをコードする配列を融合させたものを作製した（図20）。また、コントロールとして、p21コード配列のないものを作製した（図20）。これを定法によりポリペプチドを発現させ、脊髄損傷後の機能回復に作用するかどうかを調べた。

#### 【1053】

200gの雄性Wistar系ラットの第9胸椎の椎弓切除を行った後、脊髄の背側半分を切断した。持続浸透圧ポンプを用いて損傷部位へ上記TAT結合p21およびコントロールタンパク質の持続的な投与を2週間行った。このときに、ポンプに接続したチューブの先端を髄腔内に留置した。

#### 【1054】

脊髄損傷後の機能回復として、BBBスコア（Basso-Beattie-Bresnahan (BBB) Locomotor Rating; Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC, J Neurotrauma 12 (1): 1-21 (1995)）を使用し、損傷後の2日から6週間にわたって観察を行った。その結果を図21に示す。

#### 【1055】

図21に示すように、TAT結合p21ポリペプチドを投与した群では、顕著な脊髄機能の回復が見られたのに対して、コントロール群ではそのような回復はほとんど見られない。したがって、本発明のTAT結合p21は、実際の神経系の再生を促進し、しかも機能回復ももたらすことが明らかになった。

#### 【1056】

また、p21においてTAT PTDドメインが作用することが明らかになったことから、このように、TAT PTDドメインは、神経再生のための組成物を、実際に作用させるために顕著な効果を示すことが明らかになった。

#### 【1057】

（実施例4-9：他のRhoキナーゼ阻害剤）

実施例の実験を、Rhoキナーゼに対して特異的に相互作用する因子としての阻害剤を用いた場合でも同様にインビトロで神経突起が伸長することが観察され、かつ、インビボで神経が再生することが観察された。

#### 【1058】

(実施例5: PKCおよびIP<sub>3</sub>の効果)

本実施例において、PKCとIP<sub>3</sub>との調節がp75シグナル伝達においてどのような影響を与え、神経再生において効果を奏するかどうかを確認した。

## 【1059】

## (方法)

## (カルシウム画像化)

全ての実験手順は、大阪大学によって承認されたものを利用した。培養した顆粒細胞を、4mM Fura Redおよび4mM Oregon Green 488BAPT A-1 (Molecular Probes, Eugene, Oregon) の細胞透過性アセトキシメチルエステルとともに、37℃で1時間、同時局在化させ、そしてLeica共焦点画像化システムを用いて画像化した。Hank's MEMを使用して、実験の間のpH変化を回避した。p75の細胞外ドメインに対する抗体を、画像化の2時間前に添加し、そしてU73122 (50nM) を画像化の30分前に添加した。細胞を、アルゴンレーザーからの488nmの光を用いて照射した。細胞体全体からの蛍光画像を、レシオメーター (ratiometric) をカルシウム測定のために使用した。Fura RedおよびOregon Green発光シグナルを、それぞれ605~700nmおよび500~560nmにて収集し、そして10秒間隔で分析した。Oregon Green/Fura Red比率は、530nmにおけるピクセル値を640nmにおけるピクセル値で除算することによって計算した。25μg/mlの濃度のMAG-Fcキメラ (RD Systems Inc., Minneapolis, MN, USA) を使用した。

## 【1060】

## (PKCアッセイ)

プロテインキナーゼC系の非放射性検出のためのPepTagアッセイキット (Promega, Madison, Wisconsin) を用いて、PKCアッセイを実行した。血清飢餓させた培養小脳顆粒細胞を、PTX (20mg/ml) の存在下または非存在下で、MAG-Fc (25μg/ml) またはNogoペプチド (Alpha Diagnostic, San Antonio, TX, USA; 4μM) によって刺激した。各サンプルを、PKC基質PepTagC1ペプチド (2μg) を用いて、30℃で30分間インキュベートした。サンプルを、0.8% アガロースゲル上で100Vにて15分間分離した。リン酸化されたペプチド基質は、陽極 (+) に向かって移動し、一方、リン酸化されていないペプチド基質は、陰極 (-) に向かって移動した。このゲルを、トランスイルミネーター (Upland 95-0220-03) 上で撮影した。

## 【1061】

## (神経突起伸展アッセイ)

脊髄神経節を、P1ラット (日本クレア、東京、生後1日齢) から取り出し、そして0.025% トリプシン (Sigma) を用いて15分間37℃でインキュベーションすることによって、単一細胞に分離させた。小脳ニューロンについて、2匹の動物 (p7ラット (日本クレア、東京、生後7日齢)) 由来の小脳を、5mlの0.025% トリプシン中で合わせ、粉碎し、そして37℃で10分間インキュベートした。10% FCSを含むDMEMを、添加し、細胞を800rpmにて遠心分離した。ニューロンを、ポリ-L-リジンでコーティングしたチャンバスライド上のSato培地 (GibcoBRL) 中、プレートに播いた。伸展アッセイについて、プレートに播いた細胞を、24時間インキュベートし、そして4% (重量/容積) パラホルムアルデヒド中で固定し、そしてニューロン特異的βチューブリンIIIタンパク質を認識するモノクローナル抗体 (TuJ1) を用いて免疫染色した。次いで、最も長い神経突起の長さまたは各βチューブリンIII陽性ニューロンの総プロセスでの伸展を、決定した。示される場合、MAG-Fc (25μg/ml) またはNogoペプチド (4μM)、PTX (Sigma, St. Louis, Missouri, USA; 2ng/ml)、U73122 (Sigma; 20nM)、Xests本銀C (Sigma; 1μM)、または細胞透過性PKCインヒビター20-

28 ( $2\mu\text{M}$ ; Calbiochem) を、プレートに播いた後、培地に添加した。

【1062】

(成長円錐崩壊アッセイ)

E12ヒヨコ脊髄神経節の外植片を、 $100\mu\text{g}/\text{ml}$  ポリ-L-リジンで予めコーティングしたプラスチックスライド上にて24時間インキュベートし、そして示された濃度の可溶性CNSミエリン抽出物 (Sigma) (MAG-Fc ( $25\mu\text{g}/\text{ml}$ ) またはNogoペプチド ( $4\mu\text{M}$ )) を用いて30分間処理した。外植片を4% (重量/容積) パラホルムアルデヒド中で固定し、そして蛍光標識ファロイジン (Sigma) を用いて染色した。

【1063】

(GTP-RhoAのアフィニティー沈降)

細胞を、 $50\text{mM}$  Tris (pH 7.5)、1% Triton X-100、0.5% デオキシコール酸ナトリウム、0.1% SDS、 $500\text{mM}$  NaCl、 $10\text{mM}$   $\text{MgCl}_2$ 、ならびに $10\mu\text{g}/\text{ml}$  ロイペプチンおよび $10\mu\text{g}/\text{ml}$  アプロチニン中に溶解した (Tang S. et al., J. Cell Biol. 138. 1355-1366 (1997))。細胞溶解物を、13,000g、 $4^\circ\text{C}$ で10分間の遠心分離によって清澄化し、上清を、Rhotekinビーズ (Upstate Biotechnology) のGST-Rho結合ドメインの $20\mu\text{g}$ を用いて、 $4^\circ\text{C}$ にて45分間インキュベートした。このビーズを、洗浄緩衝液 (1% Triton X-100、 $150\text{mM}$  NaCl、 $10\text{mM}$   $\text{MgCl}_2$ 、 $10\mu\text{g}/\text{ml}$  ロイペプチンおよび $10\mu\text{g}/\text{ml}$  アプロチニンを含む、 $50\text{mM}$  Tris (pH 7.5)) を用いて4回洗浄した。結合したRhoタンパク質を、RhoAに対するモノクローナル抗体 (Santa Cruz Biotechnology) を用いてウエスタンブロッティングによって検出した。

【1064】

3つの異なるミエリンタンパク質 (MAG、Nogoおよび稀突起神経膠細胞ミエリン糖タンパク質) は、共通のレセプターであるNogoレセプターに結合することによって、軸索成長を阻害する。Nogoレセプターは、細胞表面に連結したGPIであり、そして細胞内シグナル伝達ドメインを有さないため、Nogoレセプターは、ミエリンタンパク質に対する結合パートナーとして機能する。近年、Nogoレセプターと複合体化したp75が、これらのタンパク質のシグナル伝達エレメントであることが示された (Yamashita, T., et al. J. Cell Biol., 157, 565-570 (2002); Wang K. C. et al. Nature 420, 74-78 (2002); およびWong S. T., et al., Nat. Neurosci. 5, 1302-1308 (2002))。低分子GTPase Rhoが、ミエリンによる増殖阻害シグナル伝達の重要な細胞内エフェクターであることの実証は、関与するシグナル伝達機構を理解するための1つの可能性のある手掛かりである。その活性なGTP結合形態において、Rhoはアクチン細胞骨格を堅くし、それによって軸索伸長を阻害し、そして増殖円錐の破壊を媒介する (Davies, A. M., Curr. Biol. 10, R198-200 (2000); Schmidt, A., et al., Genes Dev. 16, 1587-1609 (2002))。Rho GTPaseファミリーのメンバーであるRhoAは、p75依存性機構を介して、MAG、Nogoおよび稀突起神経膠細胞ミエリン糖タンパク質によって活性化され、このようにして、生後感覚ニューロンおよび小脳ニューロンからの神経突起伸展を阻害する (Yamashita, T., et al. J. Cell Biol., 157, 565-570 (2002); Wang K. C. et al. Nature 420, 74-78 (2002))。p75を介したMAGおよびNogoによるRhoA活性の調節は、Rho GDIからのRhoAの放出によって媒介された。このことは、RhoAの活性を抑制されたことを示す (Yamashita T., et al., Nat. Neurosci. 6, 461-467 (2003))。

## 【1065】

RhoAは、軸索成長の調節において主要なプレーヤーのようであるが、本発明者らは、いくつかの他のシグナルがミエリン由来インヒビターの効果に関与し得る可能性について、興味を持った。MAGが生後4日まで脊髄神経節(DRG)ニューロンからの軸索成長を促進すること(Johnson, P. W., et al., Neuron 3, 377-385 (1989); Mukhopadhyay, G. P., et al., Neuron 13, 757-767 (1994))は、興味深いことである。この知見によって、ミエリン由来タンパク質が軸索再生を阻害もするし、促進もする、二機能性分子であるという可能性が導かれた。この仮説を評価するために、本発明者らは、これらのタンパク質によって調節され得る他のシグナルを追求した。MAGは培養Xenopus脊髄ニューロン中の細胞内 $Ca^{2+}$ 濃度の上昇を急速に引き起こすということが、以前に示された(Wong S. T., et al., Nat. Neurosci. 5, 1302-1308 (2002))。MAG依存性の軸索成長円錐の崩壊は、 $Ca^{2+}$ シグナル伝達を必要とする。本発明者らは、生後7日(p7)のラット由来の小脳顆粒ニューロンを用いてこの結果を確認することによる、一連の実験を開始した。 $Ca^{2+}$ 感受性蛍光色素であるOregon-green 488BAPTA-1およびFura Redを用いた蛍光画像化によって、MAG-Fcを培地に添加した後1分以内に、細胞質ゾル $Ca^{2+}$ が細胞の体において有意に上昇したことが示された(図23a, b)。本発明者らは、神経突起上の $Ca^{2+}$ シグナルをモニターすることはできなかった。なぜなら、これらの小さい顆粒細胞の神経突起に充填された蛍光色素の量が限られていたからである(Xiang, Y. et al., Nat. Neurosci. 5, 843-848 (2002))。この $Ca^{2+}$ 上昇は、U73122(ホスホリパーゼC(PLC)の特異的なインヒビター)によってブロックされた。PLCは、ニューロンにおいて、Gi(ヘテロダイマーGTP結合タンパク質)の主要な下流のエフェクターであるので、細胞内 $Ca^{2+}$ 上昇は、Gi-PLCの活性化に依存し得る。Gi経路の関与は、以前に、MAGがニューロトロフィン誘導性cAMP蓄積を阻害するという観察によって示唆され(Cai, D., et al., Neuron 22, 89-101 (1999))、これは、Gタンパク質(Giタンパク質、およびGoタンパク質)の特異的なインヒビターである百日咳毒素(PTX)によって減弱される。以前に報告されたように(Wong S. T., et al., Nat. Neurosci. 5, 1302-1308 (2002))、MAGによる $Ca^{2+}$ の上昇は、p75の細胞外ドメインに対する抗体によって阻害され(データには示さない)、このことは、p75が $Ca^{2+}$ シグナルに関与することを実証する。これらの知見は、以前の知見を確認するだけでなく、Gi-PLCがMAGによって活性化されることも示唆する。PLCの活性化は、ホスファチジルイノシトール4, 5-ビスホスフェート( $PIP_2$ )の加水分解を導き、2つの細胞質第2メッセンジャー(ジアシルグリセロール(DAG)およびIP3)を産生する(Berridge, M. J., Neuron 21, 13-26 (1998))。内部貯蔵からのIP3感受性 $Ca^{2+}$ 放出に起因する $Ca^{2+}$ 上昇を伴うDAGの産生は、PKCを活性化する。これらの事実から、本発明者らは、PKCが小脳顆粒ニューロン中のMAGまたはNogoシグナル伝達に関与するか否かを調べる実験を試みた。培養顆粒細胞を25  $\mu$ g/mlのMAGまたは4  $\mu$ gのNogoペプチドを用いて5分間処理した場合、PKC活性は、有意に増加した(図23c)。MAG-FcまたはNogoペプチドによるPKCの活性化は、20 ng/ml PTXによって妨害された。これらの結果は、PKC活性化ならびにIP3レセプター活性化を誘発する、MAG媒介Gi経路またはNogo媒介Gi経路の活性化を示唆する。

## 【1066】

本発明者らは次に、Gi経路が神経突起伸展に対するMAGまたはNogoの効果と関連するか否かを調べた。可溶性MAG(これは、ミエリンから大量に放出され、かつインビボで見出される)およびMAG-Fcは、軸索成長を強力に阻害し得ることが、示された(Tang S., et al., J. Cell Biol. 138, 1355-13

66 (1997); Tang, S. et al., Mol Cell. Neurosci. 9, 333-346 (1997))。25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度のMAG-Fcは、P7ラット由来の小脳顆粒ニューロンの神経突起伸展を阻害した(図24a)。Fcは、ニューロンに対して何の影響もなかった(データは示さない)。総プロセスでの伸展を測定しようとも最も長い神経突起の長さを測定しようとも、まさに同じ結果が得られた(データは示さない)。Nogoペプチド(4  $\mu\text{M}$ )もまた、神経突起伸展を有意に阻害した(図24a)。しかし、PTXもU73122も、MAG-FcまたはNogoペプチドの作用を調節しなかった(図24a)。これらの結果は、GiまたはPLCが神経突起伸長の調節に関して、MAGまたはNogoの阻害効果と関連しないことを示唆する。

#### 【1067】

PLC活性化の下流の2つの異なるシグナル伝達カスケード(PKC経路およびIP3経路)が存在する。従って、本発明者らが試験した次の仮説は、2つのシグナルのバランスが、これらのインヒビターの効果に影響を与え得るかということである。MAGおよびNogoの機能におけるPKCの関与を、最初に評価した。驚くべきことに、MAG-FcおよびNogoペプチドは、特定の膜透過性PKCインヒビターペプチドの存在下で神経突起伸展を劇的に刺激したが、PKCインヒビター自体は、成長に何の影響も与えなかった(図24b、c)。MAG-FcまたはNogoペプチドによって誘導される神経突起伸展の程度は、コントロール条件における神経突起伸展と比較して、約2倍である。他のPKCインヒビター(G06976)を使用した場合でも、同じ結果が得られた(データには示さない)。これらのデータは、PKCの活性に依存する、MAGおよびNogoによる神経突起伸長の双方向性調節を示す。

#### 【1068】

本発明者らは、ニューロン成長円錐に対するMAG-FcおよびNogoペプチドの効果をモニターするために、ヒヨコE12 DRG外植片を使用した。MAG-Fc(25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )の適用またはNogoペプチド(4  $\mu\text{M}$ )の適用の両方が、有意な成長円錐の破壊活性を示した(図25a、b)。神経突起伸展アッセイによって得られたデータと一致して、MAG-FcおよびNogoペプチドは、コントロールと比較して、PKCインヒビターの存在下で成長円錐の拡大を増強した。ウシ白質由来の精製ミエリンは、0.1~10  $\text{ng}/\mu\text{l}$  の濃度で成長円錐の破壊を誘発したが、PKCインヒビターは、ミエリンによって媒介される効果を完全に逆転させた(図25b)。これらの知見は、MAG、Nogoおよびミエリンが神経突起伸展を阻害し、そしてPKCを活性化することによって成長円錐の破壊を誘発し、一方、これらのインヒビターによる神経突起伸展の促進および成長円錐の拡大が、PKC非依存性機構によって媒介されることを示唆する。Giの阻害もPLCの阻害も、MAGまたはNogoによって媒介される効果の調節を生じなかったという事実を考慮すると、ヘテロダイマーGiおよびPLCの下流の点で分岐するこの2経路のバランス機構が、MAGおよびNogoペプチドが神経突起伸展を促進するかまたは阻害するか否かを決定し得る。

#### 【1069】

本発明者らのデータによってPKCがミエリン由来インヒビターの効果に関与することが示されたので、本発明者らは次に、GiおよびPLCの別の下流シグナルであるIP3に注目した。IP3経路がMAGおよびNogoの効果を媒介するか否かを試験するために、本発明者らは、Xest C(IP3レセプターのインヒビター)を浴に適用した。PKCインヒビターと対照的に、小脳顆粒ニューロンにおけるMAG-FcまたはNogoペプチドによる神経突起伸展阻害は、Xest Cによって影響を受けなかった(図26a)。従って、これらのニューロンにおいて、PKC経路は、IP3経路よりも優勢であり得、MAGおよびNogoに応答した神経突起伸展の阻害を導く。

#### 【1070】

MAGまたはNogoによって誘導される軸索再生の阻害から促進への変換についての可能性のある機構は、PKCがRho活性を調節するという機構である。なぜなら、Rhoは、神経突起伸長の阻害において重要なシグナル伝達分子であることが示されているか



らである(Yamashita, T., et al. J. Cell Biol., 157, 565-570 (2002); Wang K. C. et al. Nature 420, 74-78 (2002))。これに取り組むために、本発明者らは、ニューロン中のRhoA活性を測定した。エフェクタータンパク質RhotekinのRhoA結合ドメインを用いて(Ren, X. D., et al., EMBO J. 18, 578-585 (1999))、RhoAのGTP結合形態を、アフィニティー沈降させ得る。このアッセイによって、MAG-FcまたはNogoペプチドをP7ラットの小脳ニューロンに添加した30分後に、RhoAが活性化されることが明らかになった(図26b)。PKCインヒビターは、MAG-Fcによって誘導されたRho活性にも、Nogoペプチドによって誘導されるRho活性にも何の影響も与えなかった。従って、PKCの阻害による小脳ニューロンの神経突起伸展の促進は、RhoA活性のブロックによって媒介されず、このことは、PKCがRhoAの上流ではないことを示す。

#### 【1071】

MAGは、生後4日まで脊髄神経節(DRG)ニューロンからの軸索成長を促進する(Johnson, P. W., et al., Neuron 3, 377-385 (1989); Mukhopadhyay, G. P., et al., Neuron 13, 757-767 (1994))。PKCの阻害は、生後小脳ニューロンにおけるMAGによる軸索伸展の促進を導くので、IP3経路は、Gi-PLCがこれらのDRGニューロン中で活性化される場合に、PKC経路よりも優勢であることが予想される(図27a)。これを評価するために、P1ラット由来の分離したDRGニューロンからの神経突起伸展を測定した。これまでのように、MAG-Fc (25  $\mu$ M)が、DRGニューロンからの神経突起伸展を促進した(図27b)。しかし、MAG-Fcは、Xest Cで処理した場合に神経突起伸展を有意に阻害し、一方、PKCインヒビターは、この成長にたいして何の調節効果も有さなかった。これらの知見は、IP3の活性に依存する、MAGが神経突起伸展を促進することを示す。

#### 【1072】

本発明者らは、MAG、Nogo、およびミエリンによって媒介される効果に重要である新規シグナルを同定した。MAGによって誘導される細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度の上昇がp75に対する抗体を用いた処理によってなくなるので、p75は、このシグナル伝達に必要とされ得る。従って、いくつかのGタンパク質結合レセプターは、p75と機能的に関連して、PKC/IP3シグナルを伝達し得る。p75は、生存および分化を促進するニューロトロフィンに対するレセプターとして長い間知られている。ニューロンの生存およびニューロンの神経突起形成を制御する際の機能と一致して、p75は、神経系の発生段階の間に発現される。対照的に、p75は、成体の種々の病的状態において再発現され、そして、これらの状況において軸索再生のインヒビターとして作用することが示唆されている。本発明者らのデータは、ミエリン由来タンパク質が軸索成長の二機能性調節因子であることを示す進歩した概念を提供する。p75によって媒介される種々の効果は、少なくとも部分的に、p75と他の膜結合タンパク質(例えば、Trkチロシンキナーゼ、NogoreセプターおよびガングリオシドGT1b、ならびに多様な細胞内シグナル伝達分子(Dechant, G., et al., Nat. Neurosci., 5, 1131-1136 (2002))との間の相互作用の結果である。p75と関連するGi-PLCシグナルの正確な分子機構は、p75の相互作用因子について探索することによっておそらく探されるはずである。

#### 【1073】

以前の研究において、Rhoはミエリン由来成長阻害シグナルの中心的な制御機構である。Rhoは、ミエリン、MAGおよびNogoAによって活性化される(McKerracher, L. et al., Neuron 36, 345-348 (2002))。Rhoまたはその細胞内標的のうちの1つであるRhoキナーゼの不活性化は、実際にこれらの基質効果を破壊し、CNS損傷に対する潜在的な治療剤を提供する。他の有望な因子は、p75の細胞内ドメインと関連するサイレンシングペプチドである(Yamas

hita T., et al., Nat. Neurosci. 6, 461-467 (2003))。p75 (これは、現在見出されてるミエリン由来インヒビター全てからのシグナルを伝達する)は、RhoAからのRho GDIの放出を促進し、ゆえに、RhoAがグアニンヌクレオチド交換因子によって活性化されることを可能にする。このペプチドは、Rho GDIとp75との会合およびシグナル伝達を阻害する。さらに、Nogoreセプターのペプチドアンタゴニストおよびミエリン画分に対して生成されたIN-1抗体は、CNS軸索再生に有効であることが示されている (McKerracher, L. eet al., Neuron 36, 345-348 (2002))。従来提案される戦略は、阻害タンパク質をブロックするかまたは阻害タンパク質によってシグナル伝達を阻害するかのいずれかである。対照的に、本発明者らのデータは、PKCの阻害がこれらのインヒビターの機能を、神経突起伸展または成長円錐の拡大を阻害から促進へと逆転させるを実証し、これによりCNS損傷に対する強力な分子標的を提供する。ミエリン由来インヒビターは、特定の条件下で軸索切断されたニューロンに対する栄養因子として作用し得ることを示す。

#### 【1074】

このように、本発明は、PKC、IP<sub>3</sub> およびG<sub>i</sub> タンパク質の調節を行うことにより、p75シグナル伝達経路を調節し得、結果として神経再生を調節 (特に増強) を行うことができたという従来予想し得なかった効果を奏することが実証された。

#### 【1075】

以上のように、本発明の好ましい実施形態を用いて本発明を例示してきたが、本発明は、特許請求の範囲によってのみその範囲が解釈されるべきであることが理解される。本明細書において引用した特許、特許出願および文献は、その内容自体が具体的に本明細書に記載されているのと同様にその内容が本明細書に対する参考として援用されるべきであることが理解される。

#### 【産業上の利用可能性】

#### 【1076】

神経突起伸展の阻害に関連するp75とその相互作用因子との関係を明らかにすることによって、神経の再生およびその神経の再生に基づいて神経学的疾患を処置するための薬学的組成物および方法が提供される。この方法および組成物は、神経再生およびそれを必要とする処置を産業とする分野において有用である。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【1077】

【図1】図1は、MAGのニューロンに対する効果が、p75に依存することを示す。(A) 分離DRGニューロンを、MAG-Fcの有りまたは無しで24時間インキュベートし、次いで、ニューロン特異的 $\beta$ -チューブリンIIIタンパク質を認識するモノクローナル抗体 (TuJ1) を用いて免疫染色した。p75 (+/+ ) は、野生型p75遺伝子を有するマウスであり、p75 (-/- ) は、p75に変異を有するマウスである。(B) これは、1ニューロンあたりの、最も長い神経突起の平均長である。データは、平均±平均値の標準誤差である。アスタリスクは、統計上の有意性を示す (\* P<0.01、スチューデントのT検定)。(C) これは、1ニューロンあたりの、最も長い神経突起の平均長である。分離小脳ニューロンを、MAG-Fcの有りまたは無しで24時間インキュベートした。

【図2】図2は、MAGがp75依存性機構を介してRhoAを活性化することを示す。(A) これは、野生型マウス由来のMAG処理DRGニューロンに対する、C3トランスフェラーゼの効果を示し、1ニューロンあたりの、最も長い神経突起の平均長である。データは、平均±平均値の標準誤差である。アスタリスクは、統計上の有意性を示す (\* P<0.01、スチューデントのT検定)。(B) MAG-Fcの293細胞への結合を、FITCタグ化抗ヒトIgGを用いたインキュベーションによって可視化した。(C) これは、トランスフェクトした293細胞でのRhoAのAFニティー沈降である。MAG-Fc (25  $\mu$ g/ml) は、293細胞がp75

を発現する場合のみ、RhoAの活性化を誘発する。

【図3】図3は、生後小脳ニューロンでのRhoAのアフィニティー沈降を示す。(A) RhoA活性は、MAG-Fc ( $25 \mu\text{g/ml}$ ) の添加後に増大した。RhoA活性を、溶解物中のRhoA量に対して正規化したRBD結合RhoAの量によって示す。値は、時間0における細胞と比較した、RhoA活性を示す。結果は、3回の実験からの平均±標準誤差を示す。アステリスクは、統計上の有意性を示す(\*  $P < 0.01$ , スチューデントのT検定)。(B) これは、NGFがRhoA活性をすぐに阻害する(約10分)ことを示す。(C) これは、MAGの用量応答を示す。(D) これは、活性化がp75遺伝子に変異を有するマウス由来のニューロンにおいて失われていることを示す。

【図4】図4は、p75およびMAG結合の同時局在を示す。(A) DRGニューロンを、抗p75抗体およびAlexa fluor<sup>TM</sup> 568結合体二次抗体を用いて染色した。MAG-Fcの結合を、FITCタグ化抗ヒトIgGを用いたインキュベーションによって可視化した。共焦点顕微鏡での観察を、ZEISS LSM-510レーザー型走査顕微鏡で実行した。p75(左)、MAG結合(中)、および重ね合わせた画像(右)のそれぞれの、代表的な1つの視野を示す。神経突起上のマーカーの近接が、p75免疫反応性を有するほとんどのニューロン中で観察された。(B) これは、p75遺伝子に変異を保有するマウス由来のDRGニューロンへのMAG-Fcの結合を示す。

【図5】図5は、MAG、p75およびGT1bの会合を示す。(A) これは、P9小脳から調製した溶解物を用いた、p75とMAG-Fcとの同時沈降を示す。MAG-Fc沈降物において、p75に対応するタンパク質の存在が抗p75抗体によって明らかになった。(B) これは、組換えp75とGT1bとの同時免疫沈降である。会合を、プロテインAセファロースおよびFc融合p75タンパク質を用いて生成した沈降物のウェスタンブロット分析によって調べた。抗GT1b抗体によって100kDタンパク質の存在が明らかとなり(左)、このタンパク質は、抗p75抗体によってp75であることが明らかとなった(右)。(C) これは、組換えp75と他のガングリオシドとの同時沈降である。(D) これは、P9小脳から調製した溶解物を用いた、p75とGT1bとの同時免疫沈降である。GT1b免疫沈降物において、p75に対応するタンパク質の存在が抗p75抗体によって明らかとなった。下のバンドは、使用した抗体のIgGに対応する。(E) これは、トランスフェクトした293細胞を用いたp75およびGT1bの同時免疫沈降である。p75免疫沈降物において、抗GT1b抗体によってタンパク質の存在が明らかとなり(左)、このタンパク質は、抗p75抗体によってp75であることが示された(右)。

【図6】図6は、p75とRho GDIとの同時免疫沈降である。(a) これは、トランスフェクトした293T細胞から調製した溶解物を用いた、p75とRho GDIまたはRhoAとの同時免疫沈降である。p75免疫沈降物において、Rho GDIに対応するタンパク質の存在が抗Rho GDI抗体によって明らかになった。(b) これは、トランスフェクトされたN1E-115細胞におけるp75とRho GDIまたはRhoAとの相互作用に対する、MAGおよびNogoの効果を示す。データは、平均±標準誤差である。アステリスクは、統計上の有意性を示す、\* ;  $p < 0.01$  (スチューデントのt検定)。(c) これは、小脳ニューロンから調製した溶解物を用いた、p75とRho GDIとの同時免疫沈降である。会合は、MAG処理細胞およびNogo処理細胞中で観察した。

【図7】図7は、p75がRho GDIと直接会合することを示す。(a) これは、p75と組換えGST-Rho GDIまたは組換えGST-RhoAとの同時沈降を示す。会合は、精製p75およびプロテインAセファロースを用いて生成された沈降物のウェスタンブロット分析によって調べた。抗GST抗体によって、複合体中のRho GDIの存在が明らかになった。(b) これは、Rho GDIとp75の欠失変異体との同時免疫沈降である。この欠失変異体のための構築物の模式図を示

す。示した番号は、この変異体の残基に対応する。(c) これは、トランスフェクトした293T細胞中のRhoAのアフィニティー沈降である。p75の全長またはp75 ICDの過剰発現は、RhoAの活性化を誘発するが、第5ヘリックスを欠く変異p75は、RhoAを活性化しない。

【図8】図8は、p75がRho GDI活性を低減することを示す。(a) p75は、RhoAのグアニンヌクレオチド交換因子ではない。30分間で<sup>3</sup>H標識GDPのRhoAからの解離を誘導するタンパク質の能力を、測定した。GSTタンパク質またはインキュベーション緩衝液を、コントロールとして使用した。このグラフは、結合したままの初期<sup>3</sup>H-GDPの相対量の平均±3つの独立した実験からの標準誤差を示す。\*、 $p < 0.01$  (スチューデントのt検定)。(b) p75 HDは、インビトロでRho GDI活性を阻害する。Rho GDIと複合体化したRhoAのGDP/GTP交換反応を、p75 HDの存在下または非存在下で決定した。

[<sup>3</sup>H] GDP解離アッセイにおいて、Rho GDIと複合体化した [<sup>3</sup>H] GDP-RhoAからの [<sup>3</sup>H] GDPの解離を、RhoAに結合した [<sup>3</sup>H] GDPの放射能を測定することによってアッセイした。 [<sup>35</sup>S] GTPγS結合アッセイにおいて、Rho GDIと複合体化したGDP-RhoAへの [<sup>35</sup>S] GTPγSの結合を、RhoAに結合した [<sup>35</sup>S] GTPγSの活性を測定することによってアッセイした。黒丸、GST-p75 HD; 白四角、GST。\*、 $p < 0.01$ ; (スチューデントのt検定)。(c) p75は、Rho GDI活性を阻害する。Dblで刺激したRhoAのGDP/GTP交換反応を決定した。 [<sup>3</sup>H] GDP-RhoA-Rho GDI複合体 (50 nM) を、90 nM GST-Dblおよび示された濃度のGST融合タンパク質とインキュベートした。黒丸、GST-p75 HD; 白四角、GST; 白三角GST-p75 ICD。\*、 $p < 0.01$ ; (スチューデントのt検定)。(d) Rho GDIの過剰発現は、MAGおよびNogoの効果を破壊する。分離した小脳ニューロンの神経突起伸展に対するRho GDIの効果を、評価した。左; コントロールプラスミドまたはRho GDIプラスミドを用いて一過性にトランスフェクトした代表的な細胞の画像。MAG、MAG-Fc (25 μg/ml); Nogo、Nogoペプチド (4 μM); Rho GDI、mycタグ化Rho GDIでトランスフェクトした細胞。データは、平均±標準誤差である。アスタリスクは、統計上の有意性を示す、\* ;  $p < 0.01$  (スチューデントのt検定)。

【図9】図9は、Pep5がRho GDIとp75との相互作用を阻害することを示す。(a) p75と組換えGST-Pep5との同時沈降。(b) Pep5は、p75とRho GDIとの結合を用量依存的に阻害する。(c) これは、小脳ニューロンから調製した溶解物を用いた、p75とRho GDIとの同時免疫沈降である。この相互作用は、TAT-Pep5によって破壊された。

【図10】図10は、Pep5がp75の阻害作用をサイレント化することを示す。(a) 分離DRGニューロンを、Nogoペプチドの存在下または非存在下で24時間インキュベートし、次いで、ニューロン特異的βチューブリンIIIタンパク質を認識するモノクローナル抗体 (TuJ1) を用いて免疫染色した。Nogo、Nogoペプチド; Pep5、TAT-Pep5。(b) DRGニューロンの神経突起伸展。MAG、MAG-Fc; HD、p75 HD (残基368~381) に対応するペプチド; p75 (+/+), 野生型; p75 (-/-), p75遺伝子に変異を保有するマウス。データは、平均±標準誤差である。アスタリスクは、統計上の有意性を示す、\* ;  $p < 0.01$  (スチューデントのt検定)。(c) 分離小脳ニューロンを、Nogoペプチドの存在下または非存在下で24時間インキュベートした。(d) 小脳ニューロンの神経突起伸展。データは、平均±標準誤差である。アスタリスクは、統計上の有意性を示す、\* ;  $p < 0.01$  (スチューデントのt検定)。(e) 小脳ニューロン中のRhoAのアフィニティー沈降。Nogoペプチド (4 μM) およびMAG-Fc (25 μg/ml) は、RhoAの活性化を誘発し、一方、TAT-

Pep5 ( $1\mu\text{M}$ ) は、これらの効果を完全に破壊した。

【図11】図11は、p75に対する抗体がミエリンシグナルを阻害することを示す。(a) 解離小脳ニューロンを、ミエリン由来インヒビターの有りまたは無しで24時間インキュベートした。これは、1ニューロンあたりの、最も長い神経突起の平均長である。データは、平均値±平均値の標準誤差である。アステリスクは、統計上の有意性を示す；\*、 $p < 0.01$  (スチューデントのt検定)。Nogo、GST-Nogo；Fc-p75、Fcと融合したp75の細胞外ドメイン；p75-Ab、p75に対する抗体；MAG、MAG-Fc。(b) これは、小脳ニューロンにおけるRhoadsのアフィニティー沈降である。(c) これは、P9小脳から調製した溶解物を用いた、内因性p75とNgRとの同時免疫沈降である。

【図12】図12は、p75に対する抗体がマウスCST線維の運動機能を向上し、出芽を増強することを示す。(a) 抗p75抗体で処理したマウス ( $n=12$ ) の改変BBBスコアは、損傷後7日～4週目にわって、コントロール抗体で処理したマウス ( $n=12$ ) の改変BBBスコアよりも有意により高い回復であることが明らかになった。\*、 $p < 0.05$  (スチューデントのt検定)、コントロール抗体で処理したマウスと比較。SCI、脊髄損傷。(b) 抗p75抗体は、CST損傷後に軸索伸展を促進する。これは、損傷28日後の抗p75抗体で処理したマウスの、損傷部位に対して2mm尾方の灰白質の横断面における、順行性にBDA標識された軸索(矢印)である。スケールバー： $25\mu\text{m}$ 。(c) これは、CST領域に対して尾方の1横断面あたりの、BDAで標識された再生軸索の数である。データは、それぞれ、コントロールで処理した5匹のマウスまたは5匹の抗p75抗体で処理した5匹のマウスからの、平均±標準誤差を示す。\*、 $p < 0.05$  (スチューデントのt検定)、コントロール抗体で処理したマウスと比較。

【図13】図13は、E5胚由来のヒヨコ網膜ニューロンが細胞質でp21を発現することを示す。(A) E5胚由来のヒヨコ網膜を、抗p21抗体を用いて免疫染色した。各パネルにおいて、右側が硝子体であり、左側が色素上皮である。(B) これは、E5胚由来のヒヨコ分離網膜細胞中のp21免疫活性を示す。上のパネルは $\beta$ -チューブリン免疫反応性を欠く細胞であり、下のパネルはニューロンである。

【図14】図14は、DMSOで分化を誘導したN1E-115細胞におけるp21の細胞レベル下の局在である。(A～C) これらは、抗p21抗体を用いたp21の免疫細胞化学染色である。DMSOなし(A)、DMSOを1日(B)、およびDMSOを4日(C)でインキュベートしたN1E-115細胞の代表的な特徴を示す。

【図15】図15は、p21の過剰発現によるN1E-115細胞の形態変化を示す。(A) これは、N1E-115細胞の増殖を示す。細胞を、6cmディッシュに播種し、トランスフェクトし、トランスフェクションの1日後および2日後に計数する。細胞数の相対的な増大を示す。この値は、3回の独立した実験の、平均値±平均値の標準誤差である。\*、 $P < 0.01$ 、full-p21と比較(スチューデントのt検定)。GFPとGFP- $\Delta\text{NLS}$ -p21トランスフェクト細胞との間で有意な差異はなかった。(B) サイクリンD3およびpRbのウエスタンブロット分析である。N1E-115細胞を、DMSOで処理し、GFP-full-p21またはGFP- $\Delta\text{NLS}$ -p21でトランスフェクトし、1日目、2日目、3日目、および4日目に収集した。矢じりは、過剰にリン酸化されたpRbを示し、矢印は不十分なリン酸化状態のpRbを示す。(C) これは、DMSOで4日処理したN1E-115細胞またはGFP- $\Delta\text{NLS}$ -p21でトランスフェクトしたN1E-115細胞中の、p21の発現レベルである。(D) N1E-115細胞を、GFP(コントロール)、GFP-full-p21またはGFP- $\Delta\text{NLS}$ -p21でトランスフェクトした。各構築物でトランスフェクトした細胞の写真を示す。(E) これは、細胞の形態を定量化したものである。Y-27632 ( $10\mu\text{M}$ ) に30分間曝したN1E-115細胞、またはGFP、GFP-full-p21もしくはGFP- $\Delta\text{NLS}$ -p21を発現するN1E-115細胞を、3つの群に分類した；長い神経突起を有

する細胞 (long neurite)、丸い形態の細胞 (round) および他の形態の細胞 (others)。データは、3回の独立した実験の、平均値±平均値の標準誤差である。\*、 $P < 0.05$ 、コントロールと比較。\*\*  $P < 0.01$ 、コントロールならびに full-p21 と比較 (スチューデントの t 検定)。

【図16】図16は、細胞骨格機構に対する、細胞質 p21 の効果を示す。(A) NIH3T3細胞を、GFP- $\Delta$ NLS-p21 でトランスフェクトした。16時間の血清飢餓後、細胞を10%ウシ胎仔血清で処理し、固定し、ローダミン結合体化ファロイジンで染色した。(B) これは、張線維を含む細胞の定量化である。データは、3回の独立した実験の、平均値±平均値の標準誤差である。\*、 $P < 0.01$ 、GFP と比較 (スチューデントの t 検定)。

【図17】図17は、核 p21 は Rho キナーゼを沈降しないが、細胞質 p21 は Rho キナーゼを沈降することを示す。(A) これは、293T細胞中で異所性発現させたタンパク質の細胞レベル下での局在を示す。GFP-full-p21 と GFP- $\Delta$ NLS-p21 との間で局在に差異があることに留意すること。(B) 293T細胞を、GFP-full-p21 または GFP- $\Delta$ NLS-p21 と myc-Rho キナーゼとで同時トランスフェクトした。溶解物を抗 p21 抗体を用いて免疫沈降した。免疫複合体を電気泳動し、抗 myc 抗体を用いてプロットした。溶解物中の Rho キナーゼおよび p21 の発現を決定した。(C) これは、DMSO 処理によって分化している N1E-115細胞から調製した溶解物を用いて、p21 と Rho キナーゼとの相互作用を示す図である。免疫沈降した p21 を電気泳動し、抗 Rho キナーゼ抗体を用いて免疫プロットした。抗マウス IgG 抗体をネガティブコントロールとして使用した。(D) これは、組換え全長 p21 と Rho キナーゼの触媒ドメイン (GST-CAT) とのインビトロ相互作用を示す図である。示した濃度の S6 キナーゼ基質ペプチド (AKRRRLSSLRA) および Y-27632 を共にインキュベートした。

【図18】図18は、p21 が Rho キナーゼ活性を阻害することを示す。(A) Rho キナーゼの活性を、示した濃度の p21 の存在下でアッセイした。パーセンテージは、p21 の非存在下での CPM に対して比較して定量した。データは、3回の独立した実験の、平均値±平均値の標準誤差である。(B) Rho キナーゼの活性を、Y-27632 ( $10 \mu\text{M}$ ) に30分間曝した細胞、または myc-Rho キナーゼ構築物および p21 構築物を用いて同時トランスフェクトした細胞を用いて、アッセイした。Rho キナーゼの発現を、ウエスタンプロットによって決定し、相対活性を正規化した。相対活性を、myc-Rho キナーゼおよび GFP を用いて同時トランスフェクトしたコントロール細胞中の CPM に対して比較して定量した。データは、3回の独立した実験の、平均値±平均値の標準誤差である。\*、 $P < 0.001$ 、コントロールと比較 (スチューデントの t 検定)。

【図19】図19は、細胞質 p21 の過剰発現による海馬ニューロンの神経突起伸長および分枝を示す。(A) これは、コンピュータトレースによる、GFP または GFP- $\Delta$ NLS-p21 を用いてトランスフェクトした海馬ニューロンの形態を示す。初代海馬ニューロンを、GFP (コントロール) または GFP- $\Delta$ NLS-p21 ( $\Delta$ NLS-p21) を用いてトランスフェクトした。ニューロンを抗  $\beta$ -チューブリン III 抗体を用いて免疫染色し、画像分析コンピュータソフトウェアを用いてトレースした。バーは  $10 \mu\text{m}$  を示す。(B) これは、GFP または GFP- $\Delta$ NLS-p21 でトランスフェクトした初代海馬ニューロンの形態分析である。 $\Delta$ NLS-p21 でトランスフェクトしたニューロンにおいて、1ニューロンあたりの、総神経突起長、軸索長、および分枝点の数は、GFP でトランスフェクトニューロンのものと比較して増加した。データは、3回の独立した実験の、平均値±平均値の標準誤差である。\*、 $P < 0.001$ 、コントロールと比較 (スチューデントの t 検定)。

【図20】図20は、TATのPTDドメインと融合させた p21 の構築物 (下) およびコントロール構築物 (上) の略図を示す。

【図 2 1】図 2 1 は、脊髄を損傷させたラットの、p 2 1 構築物による機能回復を示す。脊髄損傷後の 2 日から 6 週間にわたって観察を行った。

【図 2 2】図 2 2 は、再生阻害に関与するシグナル伝達経路を示す。

【図 2 3】図 2 3 は、PLC-PKC/IP 3 経路が MAG および N o g o によって活性化される様子を示す。図 2 3 a は、MAG によってトリガーされる  $Ca^{2+}$  シグナル伝達が PLC 活性化に依存することを示す。530 nm および 640 nm での蛍光比率 ( $F_{530}/F_{640}$ ) における変化率を、通常の培地 (DMEM 培地) 中 および U 7 3 1 2 2 (50 nM) を加えた培地中に、MAG-Fc (25  $\mu$ g/ml) を滴下する前後での小脳顆粒ニューロンを示す。データは平均  $\pm$  S. E. を示す。

図 2 3 b では、蛍光比率 ( $F_{530}/F_{640}$ ) の比率変化 ( $\pm$  S. E. ) をまとめたものを示す。U 7 3 1 2 2 (50 nM) の前処理のあるなしでの MAG 滴下後 0 ~ 4 分の様子を示す。図 2 3 c は、培養した小脳顆粒ニューロンにおける MAG および N o g o による PKC の活性化を示す。PKC (リン酸化) の活性化は、百日咳毒素 (PTX) によって消長した。MAG は、MAG-Fc (25  $\mu$ g/ml)、N o g o は N o g o ペプチド (4  $\mu$ M) を示す。

【図 2 4】図 2 4 は、PKC が阻害されるときに、MAG および N o g o が神経突起成長を増強することを示す。図 2 4 a は、小脳顆粒ニューロンの神経突起成長を示す。MAG は、MAG-Fc (25  $\mu$ g/ml)、N o g o は N o g o ペプチド (4  $\mu$ M) を示す。PTX は百日咳毒素 (2 ng/ml) を示す。U 7 3 1 2 2 は、U 7 3 1 2 2 (20 nM) を示す。データは、平均  $\pm$  S. E. である。図 2 4 b は、剥離した小脳顆粒ニューロンを MAG-Fc および PKC インヒビターペプチドのあるなしで 24 時間インキュベートした様子を示す。ついで、これは、モノクローナル抗体 (TuJ1) を用いて免疫染色した。この抗体は、ニューロン特異的な  $\beta$  チューブリン III タンパク質を認識する。MAG は、MAG-Fc (25  $\mu$ g/ml)、PKC I は PKC インヒビター (2  $\mu$ M) を示す。図 2 4 c は、小脳顆粒ニューロンの神経突起成長を示す。MAG-Fc および N o g o ペプチドは、PKC インヒビターの存在下で神経突起成長を刺激した。MAG は、MAG-Fc (25  $\mu$ g/ml)、N o g o は N o g o ペプチド (4  $\mu$ M) を示し、PKC I は PKC インヒビター (2  $\mu$ M) を示す。データは、平均  $\pm$  S. E. である。アステリスクは、統計学的有意性を示す。\* は  $p < 0.01$  (スチューデントの t 検定) を示す。

【図 2 5】図 2 5 は、PKC がミエリン惹起される成長錐体破壊を示す。図 2 5 a は、成長錐体破壊アッセイを示す。E 1 2 ヒヨコ DRG 外植片を、MAG-Fc (25  $\mu$ g/ml) で処置した (PKC インヒビター (2  $\mu$ M) のあるなしで)。PKC インヒビターで前処理した外植片では、顕著な拡大成長した錐体が MAG-Fc によって誘導されたことが確認された。図 2 5 b は、成長錐体破壊アッセイの結果を示す。0.1-10 ng/ $\mu$ l の CNS ミエリンを用いて処置した。MAG は MAG-Fc (25  $\mu$ g/ml) を示し、N o g o は N o g o ペプチド (4  $\mu$ M) を示す。PKC I は PKC インヒビターペプチド (2  $\mu$ M) を示す。データは、平均  $\pm$  S. E. である。アステリスクは、統計学的有意性を示す。\* は  $p < 0.01$  (スチューデントの t 検定) を示す。

【図 2 6】図 2 6 は、PKC が R h o 活性化に非依存であることを示す。図 2 6 a は、小脳顆粒ニューロンの神経突起成長を示す。MAG は MAG-Fc (25  $\mu$ g/ml) を示し、N o g o は N o g o ペプチド (4  $\mu$ M) を示す。X e s t C は X e s t s p o n g i n C (1  $\mu$ M) を示す。X e s t C は、MAG-Fc または N o g o ペプチドによって媒介される神経突起成長阻害に対して影響を有しなかった。

図 2 6 b は、小脳顆粒ニューロンにおける R h o A の親和性沈降を示す。MAG-Fc および N o g o ペプチドは、PKC インヒビターの存在下でも非存在下でも R h o A を活性化する。MAG は MAG-Fc (25  $\mu$ g/ml) を示し、N o g o は N o g o ペプチド (4  $\mu$ M) を示す。PKC I は PKC インヒビターペプチド (2  $\mu$ M) を示す。

【図 27】図 27 は、神経突起成長の調節にバランス調節機構が重要であることを示す。図 27 a は、MAG および N o g o が R h o A および G i - P L C 経路を活性化することを示す。PKC が優勢であるとき、MAG および N o g o は、神経突起成長を抑制し、成長錐体成長も阻害する。IP<sub>3</sub> が優勢である場合、逆であった。図 27 b は、P1 DRF ニューロンの神経突起成長の促進が IP<sub>3</sub> に依存するが PKC には依存しないことを示す。DRG の神経突起成長は、P1 ラット由来であった。MAG は MAG-Fc (25  $\mu$ g/ml) を示し、PKCI は PKC インヒビターペプチド (2  $\mu$ M) を示す。Xest C は Xest spongin C (1  $\mu$ M) を示す。アステリスクは、統計学的有意性を示す。\* は  $p < 0.01$  (スチューデントの t 検定) を示す。

# 【配列表フリーテキスト】

【1078】

(配列表の説明)

配列番号 1: P e p 5 ポリペプチドの核酸配列

配列番号 1 は、配列番号 2 で示す P e p ポリペプチドの縮重核酸配列である。

P e p 5    A A    S e q u e n c e  
C F F R G G F F N H N P R Y C  
Cys Phe Phe Arg Gly Gly Phe Phe Asn His Asn Pro Arg Tyr Cys  
tgy tty tty mgn ggn ggn tty tty aay cay aay ccn mgn tay tgy  
tgt ttt     cgt ggt             aat cat     cct     tat  
tgc ttc     cgc ggc             aac cac     ccc     tac  
           cga gga                     cca  
           cgg ggg                     ccg  
           aga  
           agg

配列番号 1: p e p 5 縮重 DNA

tgyttyttymgnngngnttyttyaaycayaayccnmgntaytgy

配列番号 2: P e p 5 ポリペプチドのアミノ酸配列

配列番号 3: ヒト p 7 5 ポリペプチドの核酸配列

配列番号 4: ヒト p 7 5 ポリペプチドのアミノ酸配列

配列番号 5: ヒト R h o G D I ポリペプチドの核酸配列

配列番号 6: ヒト R h o G D I ポリペプチドのアミノ酸配列

配列番号 7: M A G ポリペプチドの核酸配列

配列番号 8: M A G ポリペプチドのアミノ酸配列

配列番号 9: N o g o ポリペプチドの核酸配列

配列番号 10: N o g o ポリペプチドのアミノ酸配列

配列番号 11: R h o A ポリペプチドの核酸配列

配列番号 12: R h o A ポリペプチドのアミノ酸配列

配列番号 13: p 2 1 ポリペプチドの核酸配列

配列番号 14: p 2 1 ポリペプチドのアミノ酸配列

配列番号 15: 実施例において使用されるコントロールペプチド

配列番号 16: ラット p 7 5 ポリペプチドの核酸配列

配列番号 17: ラット p 7 5 ポリペプチドのアミノ酸配列

配列番号 18: ヒト R h o キナーゼポリペプチドの核酸配列

配列番号 19: ヒト R h o キナーゼポリペプチドのアミノ酸配列

配列番号 20: T A T P T D ドメインのアミノ酸配列

配列番号 21: H I V T A T の核酸配列

配列番号 22: 実施例で使用した p 2 1 ポリペプチドの核酸配列



- 配列番号 2 3 : 実施例で使用した p 2 1 ポリペプチドのアミノ酸配列
- 配列番号 2 4 : A D B 基質ペプチド
- 配列番号 2 5 : H I V T A T の全長アミノ酸配列
- 配列番号 2 6 : ラット P K C  $\alpha$  の核酸配列
- 配列番号 2 7 : ラット P K C  $\alpha$  のアミノ酸配列

## 【配列表】

## SEQUENCE LISTING

<110> Trans-Science, Inc.

<120> COMPOSITION AND METHOD FOR NERVE REGENERATION

<130> J103573332

<140> not yet assigned

<141> not yet assigned

<150> JP 2003-92923

<151> 2003-3-28

<150> JP 2003-125681

<151> 2003-4-30

<160> 27

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic Degenerate Sequence

<220>

<221> misc\_feature

<222> (12)..(12)

<223> "n" is A , C, G or T.

<220>

<221> misc\_feature

<222> (15)..(15)

<223> "n" is A , C, G or T.

<220>

<221> misc\_feature

<222> (18)..(18)

<223> "n" is A , C, G or T.

<220>

<221> misc\_feature

<222> (36)..(36)  
 <223> "n" is A , C, G or T.

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (39)..(39)  
 <223> "n" is A , C, G or T.

<400> 1  
 tgyttyttym gnggnggntt yttyaaycay aayccnmgt aytgy 45

<210> 2  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Synthetic Sequence

<400> 2  
 Cys Phe Phe Arg Gly Gly Phe Phe Asn His Asn Pro Arg Tyr Cys  
 1 5 10 15

<210> 3  
 <211> 3386  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 3  
 gccgcggcca gctccggcgg gcaggggggg cgctggagcg cagcgcagcg cagccccatc 60  
 agtccgcaaa gcggaccgag ctggaagtcg agcgcgtccg cgggaggcgg gcgatggggg 120  
 caggtgccac cggccgcgcc atggacgggc cgcgcctgct gctgttgctg cttctggggg 180  
 tgtcccttgg aggtgccaag gaggcattgcc ccacaggcct gtacacacac agcggtgagt 240  
 gctgcaaagc ctgcaacctg ggcgagggtg tggcccagcc ttgtggagcc aaccagaccg 300  
 tgtgtgagcc ctgcctggac agcgtgacgt tctccgacgt ggtgagcgcg accgagccgt 360  
 gcaagccgtg caccgagtgc gtggggctcc agagcatgtc ggcgccgtgc gtggaggccg 420  
 acgacgccgt gtgccgtgc gcctacggct actaccagga tgagacgact gggcgctgcg 480

aggcgtgccg cgtgtgcgag gcgggctcgg gcctcgtgtt ctctgccag gacaagcaga 540  
acaccgtgtg cgaggagtgc cccgacggca cgtattccga cgaggccaac cacgtggacc 600  
cgtgcctgcc ctgcaccgtg tgcgaggaca ccgagcgcca gctccgcgag tgcacacgct 660  
gggccgacgc cgagtgcgag gagatccctg gccgttggat tacacgggtcc acacccccag 720  
agggctcgga cagcacagcc cccagcaccc aggagcctga ggcacctcca gaacaagacc 780  
tcatagccag cacggtggca ggtgtggatga ccacagtgat gggcagctcc cagcccgtgg 840  
tgacccgagg caccaccgac aacctcatcc ctgtctattg ctccatcctg gctgctgtgg 900  
ttgtgggcct tgtggcctac atagccttca agaggtggaa cagctgcaag cagaacaagc 960  
aaggagccaa cagccggcca gtgaaccaga cgccccacc agagggagaa aaactccaca 1020  
gcgacagtgg catctccgtg gacagccaga gcctgcatga ccagcagccc cacacgcaga 1080  
cagcctcggg ccaggccctc aagggtgacg gaggcctcta cagcagcctg cccccagcca 1140  
agcgggagga ggtggagaag cttctcaacg gctctgcggg ggacacctgg cggcacctgg 1200  
cgggcgagct gggctaccag cccgagcaca tagactcctt taccatgag gcctgccccg 1260  
ttcgcgccct gcttgcaagc tgggccaccc aggacagcg cacttgac gccctcctgg 1320  
ccgccctgcg ccgcatccag cgagccgacc tcgtggagag tctgtgcagt gagtccactg 1380  
ccacatcccc ggtgtgagcc caaccgggga gccccgccc cgccccacat tccgacaacc 1440  
gatgctccag ccaaccctg tggagccgc acccccaccc tttggggggg gccgcctgg 1500  
cagaactgag ctctctggg caggacctca gagtccaggc cccaaaacca cagccctgtc 1560  
agtgcagccc gtgtggcccc ttactttctg accacattc ctgtccagag agagaagtgc 1620  
ccctgctgcc tccccaaccc tgcccctgcc ccgtcacat ctgaggccac ctgccccctt 1680  
ctccacact gctaggtggg ccagcccctc ccaccacagc aggtgtcata tatggggggc 1740  
caacaccagg gatggtacta gggggaagtg acaaggcccc agagactcag agggaggaat 1800  
cgaggaacca gagccatgga ctctacactg tgaacttggg gaacaagggt ggcattccag 1860  
tggcctcaac cctccctcag cccctcttgc cccccaccc agcctaagat gaagaggatc 1920  
ggaggcttgt cagagctggg aggggttttc gaagctcagc ccacccccct catthttggat 1980

ataggtcagt gaggcccagg gagaggccat gattcgccca aagccagaca gcaacgggga 2040  
ggccaagtgc aggctggcac cgccttctct aaatgagggg cctcaggttt gcctgagggc 2100  
gaggggaggg tggcagggtga ccttctggga aatggcttga agccaagtca gctttgcctt 2160  
ccacgtgttc tccagacccc cacccttcc cactgcctg cccacccgtg gagatgggat 2220  
gcttgcctag ggcttggctc atgatggagt caggtttggg gttcgtggaa aggggtgctgc 2280  
ttccctctgc ctgtccctct caggcatgcc tgtgtgacat cagtggcatg gctccagtct 2340  
gctgccttcc atcccagacat ggacccggag ctaacactgg cccctagaat cagcctaggg 2400  
gtcagggacc aaggaccctt caccttgcaa cacacagaca cacgcacaca cacacacagg 2460  
aggagaaatc tcacttttct ccatgagttt tttctcttgg gctgagactg gatactgccc 2520  
ggggcagctg ccagagaagc atcggaggga attgaggtct gctcggccgt cttcactcgc 2580  
ccccgggttt ggcggggcaa ggactgccga ccgaggctgg agctggcgtc tgtcttcaag 2640  
ggcttacacg tggaggaatg ctccccatc ctccccttcc ctgcaaacat ggggttggct 2700  
gggcccagaa ggttgcgatg aagaaaagcg ggccagtgtg ggaatgcggc aagaaggaat 2760  
tgacttcgac tgtgacctgt ggggatttct cccagctcta gacaaccctg caaaggactg 2820  
ttttttcctg agcttggcca gaagggggcc atgaggcctc agtggacttt ccaccccctc 2880  
cctggcctgt tctgttttgc ctgaagtgg agtgagtgtg gctcccctct atttagcatg 2940  
acaagcccca ggcaggctgt gcgctgacaa ccaccgtcc ccagcccagg gttccccag 3000  
ccctgtggaa gggactagga gcaactgtat aaatggcaat tctttgacct caacctgtga 3060  
tgaggggagg aaactcacct gctggcccct cacctgggca cctggggagt gggacagagt 3120  
ctgggtgtat ttattttcct ccccagcagg tggggagggg gtttggtggc ttgcaagtat 3180  
gttttagcat gtgtttggtt ctggggcccc ttttactcc ccttgagctg agatggaacc 3240  
cttttggccc ccagctgggg gccatgagct ccagaccccc agcaaccctc ctatcacctc 3300  
ccctccttgc ctctgtgta atcatttctt gggccctcct gaaacttaca cacaaaacgt 3360  
taagtgatga acattaaata gcaaag 3386

<211> 427  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 4

Met Gly Ala Gly Ala Thr Gly Arg Ala Met Asp Gly Pro Arg Leu Leu  
 1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Leu Gly Val Ser Leu Gly Gly Ala Lys Glu Ala Cys  
 20 25 30

Pro Thr Gly Leu Tyr Thr His Ser Gly Glu Cys Cys Lys Ala Cys Asn  
 35 40 45

Leu Gly Glu Gly Val Ala Gln Pro Cys Gly Ala Asn Gln Thr Val Cys  
 50 55 60

Glu Pro Cys Leu Asp Ser Val Thr Phe Ser Asp Val Val Ser Ala Thr  
 65 70 75 80

Glu Pro Cys Lys Pro Cys Thr Glu Cys Val Gly Leu Gln Ser Met Ser  
 85 90 95

Ala Pro Cys Val Glu Ala Asp Asp Ala Val Cys Arg Cys Ala Tyr Gly  
 100 105 110

Tyr Tyr Gln Asp Glu Thr Thr Gly Arg Cys Glu Ala Cys Arg Val Cys  
 115 120 125

Glu Ala Gly Ser Gly Leu Val Phe Ser Cys Gln Asp Lys Gln Asn Thr  
 130 135 140

Val Cys Glu Glu Cys Pro Asp Gly Thr Tyr Ser Asp Glu Ala Asn His  
 145 150 155 160

Val Asp Pro Cys Leu Pro Cys Thr Val Cys Glu Asp Thr Glu Arg Gln  
 165 170 175

Leu Arg Glu Cys Thr Arg Trp Ala Asp Ala Glu Cys Glu Glu Ile Pro  
180 185 190

Gly Arg Trp Ile Thr Arg Ser Thr Pro Pro Glu Gly Ser Asp Ser Thr  
195 200 205

Ala Pro Ser Thr Gln Glu Pro Glu Ala Pro Pro Glu Gln Asp Leu Ile  
210 215 220

Ala Ser Thr Val Ala Gly Val Val Thr Thr Val Met Gly Ser Ser Gln  
225 230 235 240

Pro Val Val Thr Arg Gly Thr Thr Asp Asn Leu Ile Pro Val Tyr Cys  
245 250 255

Ser Ile Leu Ala Ala Val Val Val Gly Leu Val Ala Tyr Ile Ala Phe  
260 265 270

Lys Arg Trp Asn Ser Cys Lys Gln Asn Lys Gln Gly Ala Asn Ser Arg  
275 280 285

Pro Val Asn Gln Thr Pro Pro Pro Glu Gly Glu Lys Leu His Ser Asp  
290 295 300

Ser Gly Ile Ser Val Asp Ser Gln Ser Leu His Asp Gln Gln Pro His  
305 310 315 320

Thr Gln Thr Ala Ser Gly Gln Ala Leu Lys Gly Asp Gly Gly Leu Tyr  
325 330 335

Ser Ser Leu Pro Pro Ala Lys Arg Glu Glu Val Glu Lys Leu Leu Asn  
340 345 350

Gly Ser Ala Gly Asp Thr Trp Arg His Leu Ala Gly Glu Leu Gly Tyr  
355 360 365

Gln Pro Glu His Ile Asp Ser Phe Thr His Glu Ala Cys Pro Val Arg  
370 375 380

Ala Leu Leu Ala Ser Trp Ala Thr Gln Asp Ser Ala Thr Leu Asp Ala  
385 390 395 400

Leu Leu Ala Ala Leu Arg Arg Ile Gln Arg Ala Asp Leu Val Glu Ser  
405 410 415

Leu Cys Ser Glu Ser Thr Ala Thr Ser Pro Val  
420 425

<210> 5

<211> 1921

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

```

ggcacgaggg ggccggccgac gacgttcgtc atttagtgcg ggagggatcc tgaaccgcgc      60
ggccgaacct tccggtgtcc cgaccaggc taagcttgag catggctgag caggagccca      120
cagccgagca gctggcccag attgcagcgg agaacgagga ggatgagcac tcggtcaact      180
acaagcccc ggcccagaag agcatccagg agatccagga gctggacaag gacgacgaga      240
gcctgcgaaa gtacaaggag gccctgctgg gccgcgtggc cgtttccgca gacccaacg      300
tccccaacgt cgtggtgact ggcctgacct tgggtgtgcag ctgggccccg ggccccctgg      360
agctggacct gacgggagc ctggagagct tcaagaagca gtcgtttgtg ctgaaggagg      420
gtgtggagta ccggataaaa atctctttcc ggggttaaccg agagatagtg tccggcatga      480
agtacatcca gcatacgtac aggaaaggcg tcaagattga caagactgac tacatggtag      540
gcagctatgg gccccgggccc gaggagtacg agttcctgac ccccgaggag gaggcaccca      600
agggtatgct ggccccggggc agctacagca tcaagtcccg cttcacagac gacgacaaga      660
ccgaccacct gtcctgggag tggaatctca ccatcaagaa ggactggaag gactgagccc      720
agccagaggc gggcagggca gactgacgga cggacgacgg acaggcggat gtgtcccccc      780
cagccccctc cctccccata ccaaagtgtc gacaggccct ccgtgccccct cccaccctgg      840
tccgcctccc tggcctggct caaccgagt cctccgacct cctcctcag ccctccccca      900

```



cccacaggcc cagcctcctc ggtctcctgt ctctgttgctg cttctgcctg tgctgtgggg 960  
 gagagaggcc gcagccaggc ctctgctgcc ctttctgtgc cccccagggtt ctatctcccc 1020  
 gtcacacccg aggcctggct tcaggaggga gcggagcagc cattctccag gccccgtggt 1080  
 tgcccctgga cgtgtgcgtc tgctgctccg ggggtggagct ggggtgtggg atgcacggcc 1140  
 tcgtgggggc cgggccgtcc tccagccccg ctgctccctg gccagcccc ttgtcgtgt 1200  
 cggccccgtc taaccatgat gccttaacat gtggagtgtg ccgtggggcc tcactagcct 1260  
 ctaactccct gtgtctgcat gagcatgtgg ctcctccgtc ctttccccgg tggcgaacct 1320  
 agtgaccagc ggacacgtgg ggtgtgctgc tgctgctccc cagcccacca gtgcctggcc 1380  
 agcctgcccc cttccctgga cagggtgtg gagatggctc cggcggcttg gggaaagcca 1440  
 aattgcaaaa actcaagtca cctcagtacc atccaggagg ctgggtattg tcctgcctct 1500  
 gccttttctg tctcagcggg cagtgtcccag agcccacacc cccccaagag ccctcgatgg 1560  
 acagcctcac ccaccccacc tggggcccagc caggagcccc gcctggccat cagtatttat 1620  
 tgctccgtc cgtgccgtcc ctggggccact ggcctggcgc ctgttcccc aggctctcag 1680  
 tgccaccacc cccggcaggc cttccctgac ccagccagga acaacaagg gaccaagtgc 1740  
 acacattgct gagagccgtc tcctgtgcct ccccgcccc atccccggtc ttcgtgttgt 1800  
 gtctgccagg ctcaggcaga ggcgcctgtc cctgcttctt ttctgaccgg gaaataaatg 1860  
 cccctgaagg aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1920  
 a 1921

<210> 6  
 <211> 204  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 6

Met Ala Glu Gln Glu Pro Thr Ala Glu Gln Leu Ala Gln Ile Ala Ala  
 1 5 10 15

Glu Asn Glu Glu Asp Glu His Ser Val Asn Tyr Lys Pro Pro Ala Gln  
 20 25 30

Lys Ser Ile Gln Glu Ile Gln Glu Leu Asp Lys Asp Asp Glu Ser Leu  
 35 40 45

Arg Lys Tyr Lys Glu Ala Leu Leu Gly Arg Val Ala Val Ser Ala Asp  
 50 55 60

Pro Asn Val Pro Asn Val Val Val Thr Gly Leu Thr Leu Val Cys Ser  
 65 70 75 80

Ser Ala Pro Gly Pro Leu Glu Leu Asp Leu Thr Gly Asp Leu Glu Ser  
 85 90 95

Phe Lys Lys Gln Ser Phe Val Leu Lys Glu Gly Val Glu Tyr Arg Ile  
 100 105 110

Lys Ile Ser Phe Arg Val Asn Arg Glu Ile Val Ser Gly Met Lys Tyr  
 115 120 125

Ile Gln His Thr Tyr Arg Lys Gly Val Lys Ile Asp Lys Thr Asp Tyr  
 130 135 140

Met Val Gly Ser Tyr Gly Pro Arg Ala Glu Glu Tyr Glu Phe Leu Thr  
 145 150 155 160

Pro Val Glu Glu Ala Pro Lys Gly Met Leu Ala Arg Gly Ser Tyr Ser  
 165 170 175

Ile Lys Ser Arg Phe Thr Asp Asp Asp Lys Thr Asp His Leu Ser Trp  
 180 185 190

Glu Trp Asn Leu Thr Ile Lys Lys Asp Trp Lys Asp  
 195 200

<210> 7

<211> 2475

<212> DNA

<213> Rattus norvegicus

&lt;400&gt; 7

cagaagccag accatccaac cttctgtatc agtgctcctc gtcgcctcac tgtacttcac	60
ggaagagact tggttgactg gccacttgga gcggaatcag gagacattcc caactcaggg	120
agactgaggt gagggcccta gctcgcccac ttgctggaca agatgatatt ccttaccacc	180
ctgcctctgt tttggataat gatttcagct tctcgagggg ggcactgggg tgcctggatg	240
ccctcgtcca tctcagcctt cgagggcacg tgtgtctcca tcccctgccg tttcgacttc	300
ccggatgagc tcagaccggc tgtggtacat ggcgtctggt atttcaacag tccctacccc	360
aagaactacc cgccagtggc cttcaagtcc cgcacacaag tgggtccacga gagcttccag	420
ggccgtagcc gcctgttggg agacctgggc ctacgaaact gcaccctgct tctcagcacg	480
ctgagccctg agctgggagg gaaatactat ttccgaggtg acctgggcgg ctacaaccag	540
tacaccttct cggagcacag cgtcctggac atcatcaaca cccccaacat cgtggtgccc	600
ccagaagtgg tggcaggaac ggaagtagag gtcagctgca tgggtccgga caactgcccc	660
gagctgcgcc ctgagctgag ctggctgggc cagcaggggc taggggagcc cactgttctg	720
ggtcggctgc gggaggatga aggcacctgg gtgcaggtgt cactgctaca cttcgtgcct	780
actagagagg ccaacggcca ccgtctgggc tgtcaggctg ctttcccaa caccaccttg	840
cagttcgagg gttacgccag tctggacgtc aagtaccccc cggtgattgt ggagatgaat	900
tcctctgtgg aggccattga gggctcccat gtcagcctgc tctgtggggc tgacagcaac	960
ccgccaccgc tgctgacttg gatgcgggat gggatggtgt tgagggaggc agttgctgag	1020
agcctgtacc tggatctgga ggaggtgacc ccagcagagg acggcatcta tgcttgccctg	1080
gcagagaaatg cctatggcca ggacaaccgc acggtggagc tgagcgtcat gtatgcacct	1140
tggaagccca cagtgaatgg gacggtgggtg gcggtagagg gggagacagt ctccatcctg	1200
tgttccacac agagcaaccg ggaccctatt ctcaccatct tcaaggagaa gcagatcctg	1260
gccacggtca tctatgagag tcagctgcag ctggaactcc ctgcagtgc gcccaggagc	1320
gatggggagt actggtgtgt agctgagaac cagtatggcc agagagccac cgccttcaac	1380
ctgtctgtgg agtttgctcc cataatcctt ctggaatcgc actgtgcagc ggccagagac	1440

accgtgcagt gcctgtgtgt ggtaaaatcc aacccggaac cctccgtggc ctttgagctg 1500  
 ccttcccgca acgtgactgt gaacgagaca gagagggagt ttgtgtactc agagcgcagc 1560  
 ggcctcctgc tcaccagcat cctcacgctc cggggtcagg cccaagcccc accccgcgtc 1620  
 atttgtacct ccaggaacct ctacggcacc cagagcctcg agctgccttt ccaggagca 1680  
 caccgactga tgtgggcaa aatcggccct gtgggtgctg tggtcgcctt tgccatcctg 1740  
 attgccattg tctgtacat caccagaca agaagaaaaa agaacgtcac agagagcccc 1800  
 agcttctcag cgggagacaa cctcatgtc ctgtacagcc ccgaattccg aatctctgga 1860  
 gcacctgata agtatgagag tgagaagcgc ctgggggtccg agaggaggct gctgggcctt 1920  
 aggggggaac cccagaact ggacctcagt tattccact cagacctggg gaaacgacc 1980  
 accaaggaca gctacaccct gacagaggag ctgggtgagt acgcagaaat ccgagtcaag 2040  
 tgaggaagct gggggctggc cctgtggctc acccccatc aggaccctcg cttggcccc 2100  
 actggccgtg ggctcccttt ctcttgagag tggtaggggt gggggcggga aggggcgggg 2160  
 caggaaacag tgaggtctta gggggccggc ctcccctcct tcccggctgc tcctctctgc 2220  
 caacatcctg cacctatggt acagctccct ctcccctcct tttaacctca gctgttgaga 2280  
 ggggtgctct gtctgtccat gttatttatt gttatcctgg tctcctgtcc ccttaccggg 2340  
 cccaggacc tgtacaaaag ggacatgaaa taaatgtcct aatgacaagt gccagtctag 2400  
 acccatcctt tggaggaaag gggcatatta gtaatacttt tctcgttgct gtaacaaaat 2460  
 actggacaaa aacac 2475

<210> 8  
 <211> 626  
 <212> PRT  
 <213> Rattus norvegicus

<400> 8

Met Ile Phe Leu Thr Thr Leu Pro Leu Phe Trp Ile Met Ile Ser Ala  
 1 5 10 15

Ser Arg Gly Gly His Trp Gly Ala Trp Met Pro Ser Ser Ile Ser Ala  
 20 25 30

Phe Glu Gly Thr Cys Val Ser Ile Pro Cys Arg Phe Asp Phe Pro Asp  
35 40 45

Glu Leu Arg Pro Ala Val Val His Gly Val Trp Tyr Phe Asn Ser Pro  
50 55 60

Tyr Pro Lys Asn Tyr Pro Pro Val Val Phe Lys Ser Arg Thr Gln Val  
65 70 75 80

Val His Glu Ser Phe Gln Gly Arg Ser Arg Leu Leu Gly Asp Leu Gly  
85 90 95

Leu Arg Asn Cys Thr Leu Leu Leu Ser Thr Leu Ser Pro Glu Leu Gly  
100 105 110

Gly Lys Tyr Tyr Phe Arg Gly Asp Leu Gly Gly Tyr Asn Gln Tyr Thr  
115 120 125

Phe Ser Glu His Ser Val Leu Asp Ile Ile Asn Thr Pro Asn Ile Val  
130 135 140

Val Pro Pro Glu Val Val Ala Gly Thr Glu Val Glu Val Ser Cys Met  
145 150 155 160

Val Pro Asp Asn Cys Pro Glu Leu Arg Pro Glu Leu Ser Trp Leu Gly  
165 170 175

His Glu Gly Leu Gly Glu Pro Thr Val Leu Gly Arg Leu Arg Glu Asp  
180 185 190

Glu Gly Thr Trp Val Gln Val Ser Leu Leu His Phe Val Pro Thr Arg  
195 200 205

Glu Ala Asn Gly His Arg Leu Gly Cys Gln Ala Ala Phe Pro Asn Thr  
210 215 220

Thr Leu Gln Phe Glu Gly Tyr Ala Ser Leu Asp Val Lys Tyr Pro Pro  
225 230 235 240

Val Ile Val Glu Met Asn Ser Ser Val Glu Ala Ile Glu Gly Ser His  
245 250 255

Val Ser Leu Leu Cys Gly Ala Asp Ser Asn Pro Pro Pro Leu Leu Thr  
260 265 270

Trp Met Arg Asp Gly Met Val Leu Arg Glu Ala Val Ala Glu Ser Leu  
275 280 285

Tyr Leu Asp Leu Glu Glu Val Thr Pro Ala Glu Asp Gly Ile Tyr Ala  
290 295 300

Cys Leu Ala Glu Asn Ala Tyr Gly Gln Asp Asn Arg Thr Val Glu Leu  
305 310 315 320

Ser Val Met Tyr Ala Pro Trp Lys Pro Thr Val Asn Gly Thr Val Val  
325 330 335

Ala Val Glu Gly Glu Thr Val Ser Ile Leu Cys Ser Thr Gln Ser Asn  
340 345 350

Pro Asp Pro Ile Leu Thr Ile Phe Lys Glu Lys Gln Ile Leu Ala Thr  
355 360 365

Val Ile Tyr Glu Ser Gln Leu Gln Leu Glu Leu Pro Ala Val Thr Pro  
370 375 380

Glu Asp Asp Gly Glu Tyr Trp Cys Val Ala Glu Asn Gln Tyr Gly Gln  
385 390 395 400

Arg Ala Thr Ala Phe Asn Leu Ser Val Glu Phe Ala Pro Ile Ile Leu  
405 410 415

Leu Glu Ser His Cys Ala Ala Ala Arg Asp Thr Val Gln Cys Leu Cys  
420 425 430

Val Val Lys Ser Asn Pro Glu Pro Ser Val Ala Phe Glu Leu Pro Ser  
435 440 445

Arg Asn Val Thr Val Asn Glu Thr Glu Arg Glu Phe Val Tyr Ser Glu  
450 455 460

Arg Ser Gly Leu Leu Leu Thr Ser Ile Leu Thr Leu Arg Gly Gln Ala  
465 470 475 480

Gln Ala Pro Pro Arg Val Ile Cys Thr Ser Arg Asn Leu Tyr Gly Thr  
485 490 495

Gln Ser Leu Glu Leu Pro Phe Gln Gly Ala His Arg Leu Met Trp Ala  
500 505 510

Lys Ile Gly Pro Val Gly Ala Val Val Ala Phe Ala Ile Leu Ile Ala  
515 520 525

Ile Val Cys Tyr Ile Thr Gln Thr Arg Arg Lys Lys Asn Val Thr Glu  
530 535 540

Ser Pro Ser Phe Ser Ala Gly Asp Asn Pro His Val Leu Tyr Ser Pro  
545 550 555 560

Glu Phe Arg Ile Ser Gly Ala Pro Asp Lys Tyr Glu Ser Glu Lys Arg  
565 570 575

Leu Gly Ser Glu Arg Arg Leu Leu Gly Leu Arg Gly Glu Pro Pro Glu  
580 585 590

Leu Asp Leu Ser Tyr Ser His Ser Asp Leu Gly Lys Arg Pro Thr Lys  
595 600 605

Asp Ser Tyr Thr Leu Thr Glu Glu Leu Ala Glu Tyr Ala Glu Ile Arg  
610 615 620

Val Lys  
625

<210> 9

<211> 60615

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 9

```
aaaaagcagc tagacctgga ggagacatcc ctgggagggg ctcccaggcc aacagccaga      60
caaacattca gaatTTTTtg tgggtaggtc cagtgttttc acagcatgcg ctacacatgg      120
ctttctgtgg cctctcagta gggcatgagt gagaccatac ctagcatagt cttcaagagc      180
atgggtctggc cgggcagtag tggggcacgc ctttaatccc agcccttgag aaagcagagg      240
caggcagatt tctgagttca aggccagcct ggtctacaga gtgagttcca ggacagccag      300
ggctatacag agaaaccctg tctctgtaaa aacaaaacaa aacaaacaaa caaacaaaaa      360
aagagaacat ggtctgtacc tccttcttac ctttagcctc cgaaagtctg agctgttctt      420
atactactgt ggccaatgca tcctcttctg gaatctgcag ttatgacatc ggaagtttgg      480
agaaggccag aagctgctcc tcaggTTTT ctggcttctt gtggagacag cctgactttt      540
cccagggctg gttaaaccce aacatgtttt gtttagctgc ttctagacct gggtttgctt      600
gctggatggc agaacaaact gccaatcaca agttcttggt caagaagaag taattaagaa      660
actcgatggt ctggccgggc agtagtgggg cacgccttta atcccagccc ttgagtaagc      720
agaggcaggc agatttctga gttcaaggcc agcctgggtc acagagtgag ttccaggaca      780
gccagggcta tacagagaaa ccctgtctct gtaaaaacaa aacaaaacaa acaaacaaac      840
aaaaaaagag aacatggcct gtacctcctt cttaccttta gcctcccaa gtctgagctg      900
ttcttatact actgtggcca atgcatactc ttctggaatc tgcagttatg acatcggaag      960
tttggaagag gccagaagct gctcctcagg tttttctggc ttcttggtga gacagcctga     1020
cttttcccag ggctgggtta acccaaacat gttttgttta gctgcttcta gacctgggtt     1080
tgcttgctgg atggcagaac aaactgccaa tcacaagttc ttgttcaaga agaagtaatt     1140
aagaaactcg aggaagaaat ggggtatacgg gtctgggcac tatcttgctg gcactcagaa     1200
```



catgttcaag atagcttcta ccaggcagca ttcagagccc atcacttcag gtagcagaat 1260  
gggggcctgg aaggtgttta tgaccaggaa cctatgcctg agcctgcaat caagccagga 1320  
gttgtagttg ggatgcctct taccactgag catcaaacag tagttgaagg ctttttcctg 1380  
ctttggcagg aacagtggta actattggta aatagcctat gtggggcctg gtaccaggt 1440  
tactgagcaa gctacttatt caattctgcc ctggtttcct taaaagaata ccaggttgcc 1500  
tgcccataa tagtgactga gatgttgggc catattcaga tccctgagaa tggtcacatg 1560  
atggctagcg caggcttctg ctgagatctg cccatagaaa cttgacttta agaagcctca 1620  
gcttcttagg cttcccagaa tgcacatggg gcaggacata tcaattaggg tagaggctct 1680  
ctttctctta ccatgtactg tgcaatgagg gcctggcctt cactatccag tgtgggaaga 1740  
tcctctttgg tgaactcatt tgtgtttctg aagcaatgga catccctgtt ctggatggca 1800  
gaccgaccac tcaggacttc agcagccact ggagcagtgc aatctttaca gttactgctg 1860  
atatggaaac aggagtcctt gctcgcaaca acagctagga atattcactg ttagtatatc 1920  
attgggccct ctggtctcct ggagacggac aatatcagca tccagtttgt tcaaatgtg 1980  
tctcagggcc atgggtcagt ggctactttc ctggaaacct aacccttata tgagcttcat 2040  
tgatggtcct ggttattaca catgacattt agcacagggt gattgtcaca gggaagttga 2100  
caaagcttca tacatcatag caggacgttt ttgggttttt tgtttgtttg tttgtttgt 2160  
ttttttgaga cagggtttct ctgtgcagtc ctggctgtcc tggaactcac tctgtagacc 2220  
aggctggctt tgaactcaga aatccacctg cctctgcctc ccaagtgcag gacttcttct 2280  
gtattctcca ttcactgtt ggtagatatg taaatagcca tttcctggct atttgatag 2340  
tgggattcct tttcctgact taaattttta ttttaggtcc aacactaatt ataaacatgg 2400  
ctgaagaaat tgatctcatt tctgttttta ctcttagtag tgaatgaatg tactttgaac 2460  
caagacattt attaaccagg attacaaagc tacatttcat aaaattctat atatacagaa 2520  
cctaaaacca gggaagtgtt aggggaaatc atgcaggaag ctgttaaaac ttccacttag 2580  
gccaaaatta tgtttcagtg tttgttttg ttccagtaca aagaatgcat gtaactcagc 2640  
agtgcacttg aaaaaagaca agtccttttc agtaggtgaa agagctatgg cagaaagctc 2700

ttgaaacagg ttttatgttg gaacccatct ttcataattcc aatatatatg caaatatata 2760  
tccattttctg gccctttaac tttttcaaag ggcatacatg atagaaggca aatgtagcct 2820  
gttccacata tgagtttagg cagtgattaa gtgttttgca atagtattaa taccatagca 2880  
ctggaactgc ctattcttct gagtagtgac ccttccttta cctgaaaatg tatagacaaa 2940  
ctttgcaact gctttgtttg gtgctggtat agagtacata cctaatacat tgtataaacc 3000  
aataaagcat aaaatgcaaa cacagaatgg atgatagctc aagaaactti tgctatgtaa 3060  
tgaatcacct aaaaaggcag tggtttaaaa caacagtgc acattatitt tcatgattgt 3120  
atattggctc taggatgaag tcgcattttt tgagagaata tcactatggc tgggatagtt 3180  
aggtgtctct ttcaatgtct cttttcttcc agaataaata ggaccagaat gtgtatgaat 3240  
gctatgcggt gtatatgttg gacaccacgc aggtgcctgg ctcttgagga agtcatagag 3300  
ggcttcatat ttgctggaac tggagttatg gagagttgga aatcaccatg taggtcctta 3360  
gactcaaact tgggctgttt atttactgca agagcagtaa gttctcttaa ctagccatct 3420  
ttctagcccc attacatttt aaaagttttt tttaaaaaaa gatgtgtgtg agtgtgtatg 3480  
ctgtgattat gagctgcttg gatgctggga acagaactca ggtcttggtta aagccatttc 3540  
tccagcaacc cttcaccaac atcccacccc cacctaattc tttcttaaaa cttaaactaa 3600  
atctagggtg atattacttt gttgggacta cgaatttgct taaaaccaa caaatccat 3660  
ggcaatcaaa tatcttagtt attagaacat gcatttaaaa gtttctacaa gctgcttcaa 3720  
aaagaataca agtgaacttg ataatatagt gtactcatcc cactatatcc aaaatactat 3780  
caatgccaac ataaaaccaa tgtgaaacag aaattataac atttcttata aattctggga 3840  
atgtagtgtg tattttattc acagaacaca cttcatttca gtgctcagga gctaaaagca 3900  
gccagttgct tcagtactag acagtgcaca tgtagactga acaattggaa tgcaggcaat 3960  
cctctctcca gagtaggcag gcagccagta tttttgaaaa gtgtataaga aagataaaag 4020  
gactctgcaa atcttgaagc aaagttttct atgttctacc gttttctttc tttctttctt 4080  
tctttctttc tttctttctt tctttctttc tttctttctt tctttctttc tttctttctt 4140  
tctttctttc tttctttctt tctttctttc tttctttctt tctttctttc tttctttctt 4200

tcgatttttt gaaacagggt ttctctgtgt agctttggct gtcctagaat tcactttgta 4260  
gaccaggctg gcctcgaact cagaaatcca cctgcctctg catcccaagt gctgggatta 4320  
aaggcatgtg ccaccacacc tggctaccgt tttctttaaa gtgtagcttt ggggggggtgg 4380  
gggtgggggg gaccgcacat caggagacat gccattccag catatcaaac cagtgagtgt 4440  
agggcctccc gactcctagg aagcctgaat catccgggat gttgactcat cagcctgagg 4500  
tgagtgaana atagtgaacc aattttgcct tccaaggcat ctatttcaac gttccttccc 4560  
ccttctccct ttctgggtgac tcattctccg tgcactttta gagtccagca gaatgcaagg 4620  
ccgaaagcat tctaaacagt gagcccagag ctccgggtaa tctagcacag ctgttttgcc 4680  
tacctcattc caggcctgca gtctagaaag ggagggaact tgaaagtgtc aaataaatgt 4740  
tttgtttttc tttctccttt tgaggtgggtg gtagttatgc gttgggacca tgtctgaaaa 4800  
taagtctttt atttaaaaaa atccgtaaga cctaattcag tcttgtagt acctttctcc 4860  
actttttttt tttttttccc ttttcgggga ggaaactttc cactcctagg tccccaggat 4920  
aacgcccttc cacaggcttc ttggaaaact ctccgaatcc tggggccgca gcccgccttc 4980  
ttttggtaga ctaaaatccc gctgtaggca aggccaagtc cccgccccat tccccacta 5040  
cactaggtgg ggggtggatcc cagctccaaa tccgccttc cgaacgccgc caaggaagta 5100  
tggcaggctc cgcctgcacc ctatttctat tggacaagcc cgtgatccat cttctctatc 5160  
ccgcagccta ttggctctct gtccccgcg ccagccaagc cctcccctgc cgggaagggtg 5220  
agtcacgcca aactgggcgg agagtctgct ggcctctctc agttgctcat ctgggcgggc 5280  
ggcggctgct gcaactgagg acagggcggg tggcgcatct cgagcgcgga ggcaggagga 5340  
gaagtcttat tgttcctgga gctgtcgctt ttgcgggttc ctcggcttgg ttcggccagc 5400  
ccggcctctg ccagtcctgc ccaaccccc caaccgcccg cggctctgag gagaagtggc 5460  
ccgcggcggc agtagctgca gcatcatcgc cgaccatgga agacatagac cagtcgtcgc 5520  
tggtctcctc gtccgcggat agcccgcctc ggccccgcc cgctttcaag taccagttcg 5580  
tgacggagcc cgaggacgag gaggacgagg aagacgagga ggaggaggag gacgacgagg 5640  
acctggagga attggaggtg ctggagagga agcccgcagc cgggctgtcc gcggctccgg 5700

tgccccccgc cgccgcaccg ctgctggact tcagcagcga ctcggtgccc cccgcgcccc 5760  
gcggggccgct gccggccgcg ccccccaccg cccctgagag gcagccgtcc tgggaacgca 5820  
gccccgcggc gtccgcgcca tccctgccgc ccgctgccgc agtcctgccc tccaagctcc 5880  
cggaggacga cgagcctcca gcgcggcctc cggcgccagc cggcgcgagc cccctagcgg 5940  
agcccgccgc gcccccttcc acgccggccg cgcccaagcg caggggctcg ggctcagtgg 6000  
gtgagtgtg ctgcgcgtta cgccccctcc tcttttgtgt cttggcccgg gggaggtggg 6060  
gacgggcagg gctgctcggg accctagggc tttgtctacg agtggcaggg tgatggcgcc 6120  
cccgctggcg ggaggcgggc agaagggtgg ggcggcctcg gaagcctggg tgccttcatt 6180  
gtttgtcggg gtttcgggga gcacgtgcac cgctgccaag tcgctggttc ccattccagc 6240  
acgaagtctt cgcctatcag cagctaggag tgtgttgaag aactaggatg gtggattcct 6300  
tgggctgggc tgggctgggc tgggctgggc ttggaggtgg gaatgggaag gctgtggtgc 6360  
cctaattccct ttatttaaag gatgggcgtt tgtcgaccac tctacagttt ttttattttt 6420  
tagggcctgc cttccttcc gccgggcgtc gggggatccc cttgcactaa tcccctgttt 6480  
ctttctccct ttattggtgg ggaactggcc gagctgctaa cgtctataca gtaacccaac 6540  
tgcggtgaag ggggagcgag cgcctccagt ggcgtggttc caggagaaaa gggaaggaga 6600  
gacttttggg gaagtctgc caccgccag ttcatattgt ttaaatgtgg tgattcctac 6660  
accagcctga gaaacgagat ctgggcattt tgttccgatg gggcatagtt atccagggcc 6720  
tcagttgtgc tgtaaaagaa attgccaaat ttaatggcat ctcttagcct ttaaatgcat 6780  
cgagattgac ttgtagagaa aaggcaaaat ggttgacctt aaaaaggggc aaacctgtgg 6840  
attcctggtc aggaattagt tgaacttgtg gtagatttat cctgagacat aatgaaaatg 6900  
ttttagggca aatgttccta tattagttag aagtttttat aagtatatga tttacattga 6960  
caaaatgcat tgaatattgt tttattgccc tttttatttt ggaaaggga aaaatcaaat 7020  
tttataaaga acgagaatgc atcttaagta gtttattact ttgggacaaa gtgtcttgct 7080  
agcaaaaagc cttttttttc tttttgtaaa gtaaggtaaa aaattaaatg gtataactgc 7140  
ctgctgggaa attttcacia cattccagat ctaggaggtt ttattttttt agagaaataa 7200

tatcacccca gagcttgcag tatctttttt attacaatta actctttttat aatggggata 7260  
atgaatcaat agaagtgttc ctgggtaaca attcattatg ggcacactca aaggcactat 7320  
tcaaaaacaa ctcttacagt taaagaattt agatgaagac tgccttgtct tttcattttt 7380  
attttccttt cttttttttg agggaaacta aagtagaaaa aaagtaagta ttaaaatttt 7440  
aaactggaaa caatgattgg ccaaactata cttttcattt tttctacttt catagaaaca 7500  
agataaatag ttttgtcctt tgaatatga ggggactcag gcagcatcag cattttcittg 7560  
aaatactgac aaattttaga agatttagaa atactaacia agtttagaag aaaaaaagg 7620  
aatgttgtct acccaggaat ttgtactca ttgtgttttt tggaagcttt attcccttta 7680  
ttgaacacia caacagtgag ttgtgggtcat tgatagttaa ctcatcgcaa tacattagat 7740  
ttcttaatgc actgaagagt ttggctattg gctgggtcct attattgggtt acctaggaca 7800  
ctttacaaag ttctgggctt ccaagggtgtg gcagtaagca agactcatgc tcccctcatg 7860  
gggataatac aaaaaataag cacacaaaaa agtactaaaa atgatgggtgt tatgaaacga 7920  
taacagcttg aagggatgag aataactgaa acatgtgtac cttttttttt tccttcttaa 7980  
aaatctattt attttatgta tatgagtaca ctgtagctgt cttcagacac atcagaagag 8040  
ggcatcagat ccattgcag atggtttgtga gccaccatgt ggttgctggg aattgattga 8100  
actcaggatc tctggaagag cagtcagtgc tcttaaccgc tgggccatct ctccagcccc 8160  
atgaggaccc ttttcaaggt tgcttgatga taggaaaaag aactaagggt tgagctgcag 8220  
agaaaaaaaa atatataaa aggaattcct agggcaaaga ccctgaagca ggagtgaact 8280  
tgtttattaa ctaagattat taaggaaaac ttatgcagag tcaggtaatt aggagcctct 8340  
ggggtcacgg taaaaagtat ggcttaaaga aatagtattt taggaatatg ctacttgaat 8400  
aattacattg tgattttgga gcaaaaatgt agctttgaag gtttatagat gattagaata 8460  
aagacaaagg tgaaagcact ctgtccatgg ttagaataga caaactggga gaggctatat 8520  
ataaaccctt agcaactgtg ttaacactg ctatttacat tagttttttt ctttaactct 8580  
gatatccttc agttagtaag ttatagtttt cctgaattgc agtatctcca ttgtaatgta 8640  
ttgagacctg taccttttac ttgatgacca tttttctaga aagaatgggt catttgttct 8700

aaggaaactt agagattgat ttgaggaaag tgcagacatc agttgaccat ttttctagaa 8760  
agaatggttc atttgttcta aggaaactta gagattgatt tgaggaaagt gcagacatca 8820  
gttaagatga ctaagctgat ctttagacac attggtaatg tgaatgaaag tgtgtgatag 8880  
attaactgga attctgaagg gtattaagtc aaaataaagg aatctggatc ttattatcat 8940  
actttaattc atagtctgcc gtgtcaagct gcttttatat catgaaatca aaatggttct 9000  
tccccaaaaa aaaaaaaaaa aagattttgtg tgcgtgcaca ggccagaaac aggagggtat 9060  
ctctcttgtt gagtacagat atttagatgt tggatatccag cttgataatg agattttatg 9120  
agttggtttag tctgttttgt ttcgtttcaa aagaaaaaag atttatcaag cttctgggtga 9180  
tggtggtttc aaggcatggc atctgtcatc tacttggccg aggtaaaaac cttgtagata 9240  
atgtcacagt ggtgagagcc tggactagag gaccacaatt acatggtgag acaaggaacc 9300  
tgaggaggaag taggaaccag tcttggcctt ttataaccat catcttgtga gaactcaggt 9360  
tctagtagaa cctttattct tcctgggatt acaaccaga ttacaaccac ttcccagtag 9420  
gctgttctct ttttgtccct gggatattgaa ttgatggcct tgtgttctat agtgaagcca 9480  
ctactgactg actcacttct ccaacctctc cacitttaat attaatgtaa gttcttttat 9540  
tttgtgactt gggggctctt ctgccacagc ttattgaata tctggaatta caggtttggg 9600  
tatacaggcc cacctgtggc cccacttct taaagatatg attatctatt gatgtagaca 9660  
tgtgggagcc aagctctgta tagtatTTTT gaacagtact gaagtaatgc caaaaatacc 9720  
ttttcattag cttttctaag ttgtactctt gcagattgta cctgttgga gtgtcttgac 9780  
tatctgtcta cagttctgtg gaatggcatt tatgtgtgtg taccttttcc attttgtacc 9840  
aaagtgtctg cagaggtccg ggggatatgg ttcagtcgta gagcattgcc tcaaggattc 9900  
caagtcaggg gtttgatttt tagcattgga aaaaacactg ctatccacat gcccactg 9960  
atcaaacaaa caaatagatg cagagaattc cacagacata tagcccagta gtcctcatct 10020  
ctgatttcac tttgtgaatt tcattacttt atgttaaaag aggctaagtg gaaagattcc 10080  
aggaatagct cattagcttt aaattatatg ttgatctgat tagggtgata aattatccct 10140  
ttccaatgt atccatgctg tctgtgttgt acctccatt ttgtctcttt gtaggagaa 10200

aaactagtga cttcaaatga gcttatattt aaatgagcat taaagtaatg agattggcaa 10260  
agctttaaaa ttacttccct tgattgaaac atgaaaattt atcataagtg tatttgtata 10320  
tggaagaaaa tcagtttatt tcgggtttat ttactgtgct ttcaagagtc cactgttatt 10380  
tggggatata cctcctgggt gatggaggag aatccgtgac ctttatttca ctttaataatg 10440  
accccaaagt gcaaaagtag tttatctaag ctttatcata ggtgtgtggt ataggcaaag 10500  
agtatgtatg gagtttaata ctatttcaat tgcagggtgc ctctggcaat agtaaaaaaa 10560  
aaaaaaagga tctcatgaat aagagaactg ctgtatttaa tctcttctgc tctggtagtt 10620  
atgtagatta gcctttcctg ttacaaacag tgttgctatg aacaccttta ggtattattt 10680  
ccttggagat gaatgctgaa gggttcactg tagggttgta gaataaatcc attcaggtaa 10740  
gatttctagt tcaaaaggag cttgtataca acgttgggtg ctgacaaagt gccctataga 10800  
gcggtgacac agcttatact tccagcaaca ttgtgttaaa agaacaaatt ctttcttaag 10860  
cctttatcaa cactacattg gtaaactggt aaatagttta gcaagtagtt atactttaca 10920  
tttgtaaaaa tttctatagg cttaggttgc taagatgttt tgttctaatac attgcttttg 10980  
cctactttga gttttgattt ttatggctgc aggatcactt gagcttatat catgggctag 11040  
cttaagtttt tttttttttt taaacaaaat tattttatat gtatggttgt taggcctgtg 11100  
cttgtctgtg cacaaccgca tgcacagagg ccagaagagg gcatgggagc ccttaaaaact 11160  
ggagttacag acaattgtga gtcctgtgt ggttgctggg aatcaaactc cagtctttta 11220  
aaagcagcca gtgctcataa ctgctgagcc atttcttcag cccaggtgat cagtttttta 11280  
gcatgttttt cttgaatggt tattcgtatt ctgaccacag agtatacttt tctgtgcatt 11340  
cattttttag ttagatttat catttcaaaa aatgattttt agccgggtgt ggtggcacat 11400  
gcctttaatc ccggcacttg ggaggcagag gcaggcgaat ttctgagttc gaggccagcc 11460  
tggtctacag aatgagttcc aggacagcca aggctataca gagaaactct gtctcgaaaa 11520  
acaaacaaac aaaaaaaaaa accaaaaacc aaaacaaac aaattgtcat aaaagtcatt 11580  
gaaagtcttt agaaaggcct tttctaattt ttttttactg ttagtacatt tatgatttta 11640  
ttttaatctt tgtttgctgc ttagttctgg agtgtgaggt ttaatatat tttcatgatt 11700

taactccatt tattacatac tctgtctgac ctactgaaaa tggatatatc ctctgttcgg 11760  
cattgtttat atataagtac aaagttgttt taattactaa aggttttaaa taaaatactt 11820  
catgataggt ttttttaaaa atcagaatat ttattttttc atcagaatat ttatgtgtgt 11880  
ttaatatattt tttttactga ttttaaaaat ttattaatct ggatgcttct gttagaaatt 11940  
agtcaggttt attttatata tatatatata tatatatata tatatatata tatattttaa 12000  
tttatttttt gagacagggt ctctgtcctg gacctggctg gccttgaact ctacagagatc 12060  
tggctgcctc tgcttcccaa atgctgggac caaaggcctg tgtcaccatg tctagctcaa 12120  
tttttaagtc ttaatttacc ttttcctttt acaggaataa tttatttagt gtgtgctaaa 12180  
gcatctttgt ctactccaga attgctgttt tcatcttgat gtttaatagt attagttgct 12240  
atgtttgtat taagctctat ttgaagtaa attttgctta tgggatatgg ggtgagttag 12300  
ctggcaagga gacaagatgt ctacccaaaa cagaaaagac ttactatagc tactgacagt 12360  
agtttcaata tcagcatttt ctgcagctat ggtggatttt attacagggg aggacttttg 12420  
agctgagtga aatgactttt ttaaaaagat ttatttattt tatgtatatg agcacactgt 12480  
agctgtacag atggttgtga gccatcatgt ggttgctggg agttgaaacc tctgctcact 12540  
ccagcccca ctcactctgc ccaaaggttt attattatat gtaagtgcac tgtagctgtc 12600  
ttcagacaca ccggaagagg gcatcagatc tcattatgga tggttgtgag ctaccatgtg 12660  
gttgatggga tttgaactca gtaccttcgg aagagcatct ctccagccct gaaaatgaat 12720  
tttttatact gtaaagcatg tatgatcttt gttgaggaag aactgatgc tgttttctaa 12780  
gtcatattca ccacaggata acctttgaaa aggtacaagc aaggacagtc agtgtccagg 12840  
ctttccactc ttacaatgta taaaatccca aaaagcccat agagaactat ttcctgacct 12900  
tgaattaatg aacatgtccc ttgatacagg atagagattt tgtgtatctc ttgttagatt 12960  
tgtgcctaag cattttattg ttgttacaaa tgatactttt ttccaagcca ggtgtagtgg 13020  
tgcatacctt tgatcctagc actcaggagg cagaggctgg cagatctgag ttcaaggcca 13080  
gcctcagcta tatactaagt ttcaggtgag ccaggactac atagcaagtg tttttcccca 13140  
tatttgttcc tattatatgg aagtgcagtt tgagttttgt gtattatctt tgtatctgtc 13200



ttacactctt gataagttca ctttctttct agaaatgtat atccattctg ggtcctagt 13260  
atacatatat tttagagtatt ttgtgttaa atcttccagc gttgccaaac cttcacagta 13320  
ttcatttaac tgatagattt gcctagtttt ttgcatgtg caatgtagtt tcccttgcct 13380  
tattagatac aattttttaa attcatcaat tatatttttg gtaggtaaat ctttaaaatg 13440  
aatgtgttaa agaagacagt atttgagttg tggacattgg tgagattgta gtaaaaaatt 13500  
gcagtaatta aaaactaaca ttttagtttt actttgtaaa gtaatggact ttaagtcatg 13560  
tgatgttttt cttgaacagt caattctgtc catttctactg ggggttaaagg aaaacaagca 13620  
ctgaatatag ggataaagta agttaaaagt ctggctatgt gacttcgagg ttcatagat 13680  
gcatattca gacacactgg gaagaattaa gtttggccag cacagaagat actggaagaa 13740  
ctgggatgca ttgggaccat ttacagagg accttatttt agccaagggt tgattaaaaa 13800  
atgaacaact gggaggagct tttaaagtgt ttgaccacg agaagggatg gacagctttt 13860  
tctctctct ctcctctct ctcctctct cttctctct ctttccctt cccctccca 13920  
ccactccct cctcctctc ctctcttct cttcccttt cttcttttt ctcctcttt 13980  
ctccctttt cctgtctcc ctttcttct taagtaatat tagtgtaatg gcagtagagt 14040  
ggaaggactt accagaaaag ttgtggcttc ctcttttagca tattttaaaa taacattttc 14100  
atatatagtt gtctttatgt atatttggat atactatgat atgttatctg ctcacagtag 14160  
cacaaatgaa attaagtatt taaaatgtaa ggtttttaac tttttgaga tcagagcttg 14220  
ctccggttct tctgagtgtt ggcattgcag acatacacac cattggtttag cttttgtctc 14280  
attctgtaaa gtttgggtgtt cttaatagtt ctcagaaaag aagccatttt ccccttttat 14340  
aagcttaatc agtgtatatg tcaacttct cagaaatgca gagtgttaca tctttttatt 14400  
taaaatagcc ccctaattat agtcattcat ttgcaaaaagt gagggctttt acaaaaaaat 14460  
tactaagcta acatcaacag ctgtttttca aaacaagcga tacttttagg catttttaga 14520  
ctaaaatttg tttcccttc tgcaccagtt tgagatagat gctaatatgt tgttttatga 14580  
atgaggggct gaggaggaaa gctagaaaat cccccccag ggccacacat gggcatagaa 14640  
gacccgagat ttgaattcat atgtacctgt tgcccacat tgcttaaaga cccaaaaggc 14700

ctccccctcct gcgaagcatg tttaaaatga caaaacttat tttgtgatga atgaatttca 14760  
agtttagata atgaggattt tattttcttt aaattaatga ttigaaatac taacttaaatt 14820  
gccttagttg gctaaatgcc aagtttttct atgggaaata ttctggtatt agttaaaaaat 14880  
aagatatgtt ttttaagaggt tcttgaaaaa gactggcaca attttaagtt agttcatttt 14940  
gtggctagtc ttaacaatag cttttcaatc agtgacttct aactatatgt ttagagaggta 15000  
ctattttgtt aaaaaaataa aaaaactttc tttttaaat gttcatcta gitgaatatg 15060  
ttggttctgc cttttgagcc caaatttgct ttttctttt ctttctttt ttttttttt 15120  
tccttttttg attcttcagc tgagagcaag aggatttatt gtacacaaga tacacttgac 15180  
cacaagtgag atcagaacta gtccagaatg ccaaaggcag agggccagcg ggactgtttt 15240  
ggttgtagaga aaggcagtca gtttcctcgg tgatctgggc aaggtgacat tccaggcca 15300  
ctgagactta ttaccgacag cagcctgcag tctaacaact gtacctggct ttgagcatct 15360  
tttctgttcc tgtaggcatt gtgggtacac aagctagttt acttgacat ctgcctcatc 15420  
ttctcttgag ctgtgtttga gcctgagtat tctcctcctc tgccactttg ctctcatggc 15480  
acaagagtgt cgaggaagat ggtgctaagg ccaagcactc tttttttaac aacaaacaaa 15540  
caaacaaca aacagcccta aaacctata tctactgtat ggttatcttt gttaacttca 15600  
caccacctat attcaccctg gaagagagct ttagtgcaga gctgtctata tatattaagt 15660  
tggtctgtgt gtgtctgtcc aggattgtct tagttaattg atgtggaagg acctaatcca 15720  
gtgtaggttg taccattccc tatgtagagg tccctgcaat ttctaggagt agagaaatgg 15780  
aattgagtcc aagcaagcat gcacataatt tctcttttgc tcttgactgg ttatgatgtg 15840  
actagctgtt cctgctgtga tttctctaca attatggact ggaattgtaa gttaaataa 15900  
tcctttctcc cccaagttgc tttcagtgag gatgttttac tatatcagca gaaatgaaac 15960  
taggagagtc acacataaca ttttaagaaat atgtacatgt tgtacatacc gcagaaaatt 16020  
tcctaagtaa ctgttggtt tctggtttgg gtgatgttct ttcctaccta tttcttgttt 16080  
tactgttttt ggttgtagact atgcttgtgg tttgtgacca gtgtctaacc aaactgttga 16140  
acctggtctt gaacatggga attcacgtga ttctcccttt tctttctttc ttgtttgttt 16200

tttgttttgt ttttttcaag acagggtttc tctgtgtagc cctggctgtc ctggaactca 16260  
ctttgtagac caggctggcc tcgaactcag aaatccactt gcctctgcct cccagtgct 16320  
gggattaaag gcgtgtgcc aactgcccc gctgattctc cttttccag tctcatgagt 16380  
aggttgggat tgtaggcatg cactgccatg cctgggttat ggagacctt ttaaacttt 16440  
cagctttttt ttttttctc accatctatc tcactaagg atgctgtgac attgtgcctt 16500  
gtggggattt agtcacaatt tatttagcat tatgaaatta cctatcccct gttgattaag 16560  
gggacttgga agagaagtcc atttttttt tttttttt tttgttaact atatatatct 16620  
tttactctgt gttaatcagc attgtttagc ttgtatttag cttgtattta cttggtagaa 16680  
gtgtctttcc aagtttattg ggtcatcttt cctgttatgc tttgaattat tccaagtagt 16740  
cctgtgctgg agtctttccc tactatata aaaacagaag attttttagt tttctgaacg 16800  
ggtacaaaag atattatata caacgttaac cctgtaatga atactgtatt gtctacttga 16860  
gttgacagta caaatataa gatgggtagc taaaacaaca gacgtttctc acaatgctaa 16920  
agattgagaa gattcattag cttgtcagca aggtcgattt tattgtgaga caacctcttg 16980  
gtagcttgct ttctgtgcat attctctggt atctcctctt gcgagggcag taatcacatt 17040  
gagtcagagc ctcatcttca ggacctcatc taactctggt cacctcccct aagctatctc 17100  
tggacatcta atgtaggaag ttaaaaattt aacctgggaa tgtggccagg gcacaaacat 17160  
tgctgtattt tatgtaggaa agattggagc ttaattatag gagtgcctcc cgttagtgtt 17220  
gaaattagtt tttgttgttg ttggattgtt ttttaatttt atataaagg gaactattac 17280  
caccattatg acaatagggt ggtatgtaaa gtaaattgta gggataaaa tacttaaaac 17340  
aaatgagaag gcaaccaatg ataataagag tagggctgct tttatcttg agtggcattt 17400  
ggacagtggc acatgactta tcttcagtac tgttcagtac tgccatgcac tgtaagagaa 17460  
gaatataaaa gaaagtatgt aattctcaga aagtgcctt ttaaattgaa catatgctag 17520  
gaacaaatga ttacttgaag tagttattaa tttatcatat ttaatctttt atgattaaag 17580  
atggagtagg acaaggtttg gatacagtat attaatgat aatactgtgt ggaaaatcac 17640  
tttgggtcaa actcaatata aacatgctgt attgcctctc aaacaatgac taacatttag 17700

tcatattagt tactatttcc tacttccttt ctgccttact agccatttct cttaaaatgt 17760  
ggttagctca ttgtgaactt ccccttgctt agtctcttgc tttcactcct ccagcctgct 17820  
tgtatttctg ctgaggttgt attctgtttg tttttcagat gagacccttt ttgctcttcc 17880  
tgctgcatct gagcctgtga taccctcctc tgcaggcaag ttctttctgc cagcctttct 17940  
tctgtattct aactcactct aatgttaact caacagagta ctttgcatth actagaaatc 18000  
aatgttggtc caagaatgtt gtttttacia gagagacatg gtcaggattt gattcataat 18060  
tgtaattcat aaggaattct tggactcttg gtttatattt acataatcat tcattttctt 18120  
caaatagttt gcctttgtat agccacaggc ctttatgtaa tggaatacct gtctcattgc 18180  
ctttgataat ccagtaccct gtctggcctg tgcagctggg tactcactca tcaaacttta 18240  
ctttctcttt aaactattta gaaatagctt tttctagtta gtaacacctg aagttttctc 18300  
agatttgatt tatactctgc atagtaggta actgcctctg aaactgcaca ttattctttt 18360  
ttcttttaggt actttaataa ctgtatttat agggtagagt gtgatgatcc catacattat 18420  
tcattgttgc ctggtcaggg ttagccgatt agcatatcca tcactttaga tgtttttaat 18480  
tactttgtag tgatttagag tcttcacttg gctataaaca ttgttaactg ttgtacagta 18540  
gccatgtact cttaaaaatt gacaatagtt catattttca gtaatgatcc aagtctgtat 18600  
ttattaacta aatgctattc atattcattt aataataaat gtttactaac acttttatta 18660  
atatgtcata atacttgcatt tagctctgag aacattggca ttctctaatt ttcctttcta 18720  
tccatggcca cagaaaaaat tatggatttg aaggagcagc caggtaacac tgtttcgtct 18780  
ggtcaagagg atttcccatc tgtcctgttt gaaactgctg cctctcttcc ttctctatct 18840  
cctctctcaa ctgtttcttt taaagaacac ggataccttg gtaacttatc agcagtggca 18900  
tccacagaag gaactattga agaaacttta aatgaagctt ctagagaatt gccagagagg 18960  
gcaacaaatc catttgtaaa tagagagtca gcagagtttt cagtattaga atactcagaa 19020  
atgggatcat ctttcaatgg ctccccaaaa ggagagtcag ccatgttagt agaaaacact 19080  
aaggaagaag taattgtgag gagtaaagac aaagaggatt tagttttagt tgcagccctt 19140  
cataatccac aagagtcacc tgcgaccctt actaaagtgg ttaaagaaga cggagttatg 19200

tctccagaaa agacaatgga catttttaaat gaaatgaaaa tgtcagtgggt agcacctgtg 19260  
agggaagagt atgcagattt taagccattt gaacaagcat gggaagtga agatacttat 19320  
gaggaagta gggatgtgct ggctgctaga gctaatatgg aaagtaaagt ggacaaaaaa 19380  
tgctttgaag atagcctgga gcaaaaagggt catgggaagg atagtgaag cagaaatgag 19440  
aatgcttctt tccccaggac cccagaactt gtgaaggacg gctccagagc gtacatcacc 19500  
tgtgattcct ttagctcagc aaccgagagt actgcagcaa acattttccc tgtgctagaa 19560  
gatcacactt cagaaaacaa aacagatgaa aaaaaaatag aagaaaggaa ggcccaaatt 19620  
ataacagaga agactagccc caaaacgtca aatcctttcc ttgtagcaat acatgattct 19680  
gaggcagatt atgtcacaac agataattta tcaaagggtga ctgaggcagt agtggcaacc 19740  
atgcctgaag gtctaacgcc agatttagtt caggaagcat gtgaaagtga actgaacgaa 19800  
gccacaggta caaagattgc ttatgaaaca aaagtggact tgggtccagac atcagaagct 19860  
atacaagagt caatttacc cagcagcag ctttgcccat catttgagga agctgaagca 19920  
actccgtcac cagttttgcc tgatattgtt atggaagcgc cattaaattc tctccttcca 19980  
agcactgggtg cttctgtagc gcagcccagt gcatccccac tagaagtacc gtctccagtt 20040  
agttatgacg gtataaagct tgagcctgaa aatccccac catatgaaga agccatgagt 20100  
gtagcactaa aaacatcgga ctcaaaggaa gaaattaaag agcctgaaag ttttaatgca 20160  
gctgctcagg aagcagaagc tccttatata tccattgcat gtgatttaat taaagaaaca 20220  
aagctctcca ctgagccaag tccagagttc tctaattatt cagaaatagc aaaatttgag 20280  
aagtcggtgc ctgatcactg tgagctcgtg gatgattcct caccgaatc tgaaccagtt 20340  
gacttattta gtgatgattc aattcctgaa gtcccacaaa cacaagagga ggctgtgatg 20400  
ctaatgaagg agagtctcac tgaagtgtct gagacagtaa cacaacaaa acataaggag 20460  
agacttagtg cttcacctca ggaggtagga aagccatatt tagagtcttt tcagcccaat 20520  
ttacatatta caaaagatgc tgcattctaat gaaattccaa cattgaccaa aaaggagaca 20580  
atttctttgc aatggaaga gtttaatact gcaatttatt ccaatgatga cttactttct 20640  
tctaaggaag acaaaatgaa agaaagtga acattttccg attcatctcc cattgagata 20700

atagatgagt ttccacatt tgtcagtgct aaagatgatt ctcctaagga gtacactgac 20760  
ctagaagtat ccaacaaaag tgaaattgct aatgtccaga gcggggccaa ttcgttgctt 20820  
tgctcagaat tgccctgtga cttttctttc aagaatacat atcctaaaga tgaagcacat 20880  
gtctcagatg aattctccaa aagtaggtcc agtgtatcta aggtgccctt attgcttcca 20940  
aatgtttctg ctttgaatc tcaaatagaa atgggcaaca tagttaaacc caaagtactt 21000  
acgaaagaag cagaggaaaa acttccttct gatacagaga aagaggacag atccctgaca 21060  
gctgtattgt cagcagagct gaataaaact tcaggtaata atccatgcac cgtctcacca 21120  
acttcttggt ttactatgga atacagataa cgttttgtga cataacattt ataatgtatc 21180  
atgtctactg tgtcatgttg atgagaatct tttttactag ttcagtttta gttctgtggg 21240  
gctggaaaga tggctcagta gctaagagca cttgctgac ttttaccctc tacaagactt 21300  
aattaagttc gcttcccat caccgatgtg gtctctcaca atcggctata cctccagccc 21360  
taagggatct gatgccctct ttgacctcta tgggcaacag acacatctga tccacatgca 21420  
cacacacgtg caggtgaaac actcatacac aaaaaatcta aaatagagaa tgattaagaa 21480  
aaaaagtttg ttctatccag gtagtacagt atagtctcaa ctgcaatcag gagttcaaag 21540  
taaaaggatt cttgtgaatt tgttgcaaaa accaagaata caaaagtttt atgttatttc 21600  
ttccacctc acttctactt aacactcatc ttactgtag gcttttccat agttttgcat 21660  
caatgaaacc aggaaaaaat tagtaaaatt atctttcatg atgcattctt ttcttcagtg 21720  
tttctgctg ctgtgacaag caagggatat taaaacaata ttttcatata tgtttatttt 21780  
tatcttagat atgatttcat gacaaacttg caaaagatga ccatttctgt tgcttgcttt 21840  
tggtatttac ataaaataca ttatttttct agtgagaggt atgaggctag aaatactaag 21900  
tatagatttt tttaaagaaa gtaattactg aaacatgcta tcaatttatg aaaagctctg 21960  
tttatgtatt ttaagtgtg ggagtgtct gtctgcatgt atacctacat gccagaagag 22020  
ggcatcagat ccctttatag atggccttaa gccaccatgt ggttgctgag aattgaactt 22080  
aggctcctctg gaagagcctc cagtggccag tgttcttaac cactgagcca tctcaccagc 22140  
cctcatttat acttttgact caacatttgc tatgcttggt ttgaatgctt ttttttaaac 22200

ttggcattct gttagctgtg ttttctagta gcagttatgt tgtatttact tacatattag 22260  
agacagctag catcagatga gtatagaaat taattctgtt acaagaggag agtctgaata 22320  
ttcagataat gaatccggca tcctcctcct gttgggagga tatggagaga agtaccaaga 22380  
ttctgggtgc ctgtcatgtg tgcaagttag caacatgaga acaaaggtg ggggcacatg 22440  
agaaaataaa atggggtttgg gagaagatta atttaatttg aatatattag tattgagact 22500  
attaattgag tattgagaat tattaatgcc atatctaaga aactttgaaa caacttgtct 22560  
ggctattaca tgcataatth gccatgaact tggagctaaa aattaaagcc acagatagga 22620  
acaagggaaa atcagaatgc aaagataaat gggcaacacg ttaagagcta aggattgaaa 22680  
aaggagggaa gtaagtacgt gcaaccaaga cgcagacaga ctcaattttg ataacagaac 22740  
aagaacaaga aggaaaaatg ttagccagca gaggaatgga atatggaatc gaagaggaga 22800  
ttctcctccc cactcacttt aggagaatca gttaataggt gctaatagtt aatagttaaa 22860  
atgtacatag atgccagggt aaactctaga gtttaagtga aggggttggc tttgtagcgg 22920  
aagaaagaat actgcatgta gtgggtagaa agaaatctgt ggatgcgtat tgatactgct 22980  
agggaggatt ttgtgtctga aactgaggga cttggttgat tttaatgtta aagcagtgtg 23040  
tgaggatatt gccgagaata agttgaaaca tatttggaag agtaactgtg aaattattcc 23100  
aactagagga agcaagggca gtgtgttaag agtttactca gggctttgtg acagcagtct 23160  
aggcaagtgc attatttatt gagctatacc ctctgccag tgactttcaa tgtgctaaat 23220  
agtctggata tgggatcaga gaatgtaaca ggtcttattt gaggtagttc tgttttgta 23280  
catgggccag tagaaggaca gtgagccaag agagttgaga ataataggaa tgaagtagtt 23340  
tgaagtcatt gaaatgatgg gctggcatcc aggttgaagt gaataggaag ttgatagaaa 23400  
gagagtagta gatgaagtga attgtaggtc cagattaggt ctaagaacca aaagtgttag 23460  
gaagaaaaat gtgactctta gaatgttttg ggaaacatag taagatgtat gtgttgggta 23520  
ttgagtttag aattttactg caaaagcagc tccgagacca aggtttggcc attaagaaag 23580  
ttgctgaggc caagaggtga ccgtattgca tatgctgctt agaataatga caggatttca 23640  
ggtagacatt atggtaaggg acaagggact ggggaagtgg ttcaggaata catcacttga 23700

taaaagtata tggccagagt tcagatcctc agtaccacc cacataaaag ctigcagcta 23760  
cagcatactg aaggcagaaa gtggacaggc ttgctagcta gactacctga gtcagtaagt 23820  
tcagggttgg gcaaaaagat cctgtctcag taaacaacct gtggcatcta tatgatgtac 23880  
ttaaatgagc acgcatgcac actccctcct cccaagggtg aagaacaaac aaggacaaga 23940  
gtcttttgta aaaggctttt gggtaactga tggggagaat agacaaaagc agtaagaaaa 24000  
gatagagtgt gacctagcca ggcttctaga atgatggctt agatcgggaa gcagcattag 24060  
atagcagcag agtacttgac ttgccttgtc tccagttgtg caaagtatgg gaaagtaagc 24120  
agccttgatt ttagaagcac cacagggaaa gcagtgtcaa agaagagttg gttgttttgt 24180  
tttttttttt tttttttttt tggtttttcg agacagggtt tctctttata gctctggctg 24240  
tcctggaact cactttgtag accaggctgg cctcgaactc agaaatccac cagaaatcca 24300  
cctgcctctg cctcccagat gctgggatta aaggcgtgcg ccaccacgcc cggcgagagt 24360  
gaggttttaa tgaatgggaa gtgaaagaag gaatgcttta taaaaaatga aggattagaa 24420  
gagatggctc aggatcaata ggtttcaagc agcatgttaa cgtgccctag gggaaactgt 24480  
aaacatgcat gataacacgg tgcggtaagg ctagggagaa gcaggcataat gggcagtatt 24540  
gaaatacctg tgaaatcgcc ttctaacttc atgctacctc caaaaactca actctagtca 24600  
tatgttctta gtttgatttt ggtaaacta ggatctatag cccctagttt ggaatgaaaa 24660  
ggattaaaga gcagcagtgc cttagaaggc taaataaaaa tgctgaggaa tgggttggtg 24720  
ctgattttta aggaaacaat atcttcaaga aaatcattta gctcaacctt ttctccctt 24780  
gtatgtatgt agagatagag acagcatatg tgtgtgcccc tgaggttgat gttgggaatc 24840  
atctgcaacc actttctacc ttacattgaa gcaggctctca catatggcta gccagtctgt 24900  
tctagggacc ctatctctgc ttcccatatg ctgggattac aggtgggtca ctgtgcccat 24960  
ctggcttttt gtggttctaa gatggcagac tgatgcttgt ttgtgtggaa ggtgtttaac 25020  
ttctgagcca tatttatata tttaggttac tgtgtgataa ttgataact ttccagtgat 25080  
caagttagca ttcccatgtc gttttttttt ttgttttgtt ttgtttttt gtttttttta 25140  
agacagtttc tctgtgtagc tctggctgtc ctggaacttg ctctgtagat caagctatcc 25200



tcaaattttc agaaatccac cttcctcaga ctcatgagtg ctgggttgca ccaccactgc 25260  
ccagcttgtc agtaattttt aaacttagca ttagctgcta tgtccattct cactagagga 25320  
atagaacata atttgcattt aacaaatgtg tgtaagcctt taatcctagc acttgggaagt 25380  
cagaggcagg cagattctct gagtttgagg ctagactggg ctattgtaag ttccaggaca 25440  
gccaaggcta cacagagaaa ccctgtcttg gagaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaacaccac 25500  
caaaacaaca taacaagtgt gtatatcca taaaattcac aggaagtgtt tgtataattt 25560  
ggatgacatg aattctagtc tttctcacat ctagatagat gttgacttcc tttactgtaa 25620  
aaggaatgaa gttagattag atttttctgc ttgatatttt tcttaattac aataaacatc 25680  
tattaaaagc aggtacttat aattgctttg gcttggttgt ttgaagtact atcctgtatt 25740  
tcttttcttt gagagtgggg gagacaaaaa tctttgttct catgtaactt tggcatgcac 25800  
acacacacac aacacatggt tttgttcaag tagcttacag gctgtggtcc aggtagtcca 25860  
acaatggtta tctcttgaaa gaaaggccaa ggatctgggt ataaaactga aagtcttagc 25920  
catctcaatc ttttgcagcg ttcaggtaat tccttcagag gtcttgagtc tatgttggaa 25980  
cctcacagaa gtacattcta ataccaccag gggtattagt gccttagtaa cgggatagat 26040  
gaacttgcca gagagactga ggttaaggaa gcaaaaagca aaagcttttt atgcaggctg 26100  
gcccagattt aggttgaatc tttttccacc ttcagataat ccaggtttaa ggtgggtctt 26160  
cccatctcaa atgatcaaat caagaaaatc ctccacaggt gtgccaact acttgggttt 26220  
cttcagattt attttatgtg tatgagtgtt tgcttgattt gcttctatat atgcatcaca 26280  
tgagttcctg gtgccaggga ggtcagggtg tattgactct cctggagctg gagttaaaga 26340  
tggttgtagag ctatcaagtt ggtagagggt ttttaactttc tttttgggtt ttcgagacag 26400  
ggctgtatag cctgtatagc cctggctgtc ctggaactca cttttagtag caggctggcc 26460  
tggaactcag agatccgcct gcctctgcct cccaattgct gggattatag gagagcgcca 26520  
ccacgcccag cggtttttaa ctttctttgt taggtttatt ctaagggttt tagaatttga 26580  
aacaggttct ctctgtgcag cggggtgggg aacctggaac cctccctatg taaatcagat 26640  
tggccatgag ttttaattctt cccgccicta taccctgagt gcaagattaa atgctcttca 26700

ccacattggt tcttggttcag tgtgcccttt gatggtatgt agacagtcta ctgtatcttt 26760  
aatgctaact ttgaatccta accattttgt agaaggtggt tatcagatta tcagccttct 26820  
tgtggagtct cgaggggtctc tgatgtatag aattgtaaca cttgaaaata ggattttttt 26880  
tcttaactac ttcctttctt atttaaagtc cttttattac cttcctgtgt gttactacca 26940  
aagccaggat ttcaagcatt tattgggtcat ttgtgcttta gtttttatga attgcttggt 27000  
taacctttgt tcatttttcg attttgatgc tctatgatct tgtttttatg tgcaggggtgc 27060  
aaagtcttct ctctctaaga tttttatgca cacatcagtg gacagtttga cttttacaaa 27120  
ggaagccgct ttctttttac tactcttaat tttattctta cttagttcca atttatttat 27180  
aattgtcgca gttattttta ttcccatcat attctgatct agcctcctgg tgccaggcaa 27240  
ccattcaact gttggatgat tgagaatagc ttttgctagt ttcccagtggt ttggttaggc 27300  
aatcaaatgc agatttgggt gttggtgccca tctagtgtgg gtaatggtaa aaccatttct 27360  
atggaatatt tgataagtaa ccatactgaa taaatgtggc tggtcacaaa atttcacact 27420  
tgttataaaa caaatttata aactattttg aattttgaca ttttgtacag aattaaatac 27480  
ttgagctatg ctataagcat tctgaaatga ccctgaagat gtgtttctgt taaggtaaaa 27540  
ggcctaata gaattaatttt aaattgtaag tttagaaata ctttgggtct ttaactcact 27600  
cactctctct ctctctctct ctctctctca catgcttggt cattcgaggt cattgcattc 27660  
aaggctctcat atttgatgag gcatgtcagt ttgacttcac aaaggaaagc ctgtttcatt 27720  
ttttagtact cttttatttt tacttttagt tctgatttat ttataattgt ctggattctt 27780  
gcagagttat ttttattccc atcatattct gatttaacct cctggtgcaa gagaaacatt 27840  
ttcagtttct ctggatttta atattcatat attgaaattg ctatgtgatg ttgttaaaag 27900  
agtttgaaaa tgctcaattt tttgtcattt tgaatgttat tttttagatt tcaaataccta 27960  
ttccattttt gaatattgag ttcaccattg ttgaagtact gacttttagt ccatagaggg 28020  
cattagatta cagcatatgg tagggtttat gggtgttaat gtctctcagc agtaaaacat 28080  
ctagttttgt acctctgtgt gcttagaatt ctaaaattag tttcaagact gctgtgtaac 28140  
tgtcactgtt tcatattaat aaaagattcg ggctctccat tattaataga cgtctaaatc 28200

gtagcttccc aaaacaatat acaagcaaag taaatggctg ctctcttctc ttttctcttt 28260  
tccttccitt tccttttctt ttttttcttt tcaatcttta aaggcacagg gaaatttaaa 28320  
aggaaggaag gaaggaagga aggaaggaag gaaggaagga aggaaaagga aagggaaga 28380  
aggggaagaa gagaaagggg aagaaggaga ggaaggggaa gaagggaag ggaaaagcaa 28440  
aacaaccaa aaattttgct ggcattaaaa gtaaaagaag tggaaggagt ttgagagagc 28500  
aggatgaggt gaacaccagg tgggcttact aactaggttg ttttgtttct tttttgaaac 28560  
aaacataact atataatgtt agctggcctt gaactcagag aatgctacct gactgctttc 28620  
ccaatgctgg tttaaaggtc tgtaccattc tgggctttca catctgcttt gagacagttc 28680  
tcttgtgctt aaaatccttc caaatagata caaacittaa aaaaaaaaaa aatgctcccc 28740  
aggcagtggg ggcgcatgcc tgattccagc acttgggagg cagaggtagg tggatttctg 28800  
aatcgaggt cagcctgggt tacagagttg agttccagga caaccagggc tacacagaaa 28860  
ccctgtcttg aaaaaacaaa acaaaacaac cccaaaactc acacatgcta ctttatcaga 28920  
gatttttttt attagcaact tatttaatta tattttttct tagttaacca tgcattgtaa 28980  
aaaaaaaaa gtgttttgac taaggtaaga gagacattga aagtaggtaa ttttagatca 29040  
tcgtactctt tagaagtgag ttggagacct tgcaggctct tggttttatt tttttagcat 29100  
tatatttaca agtttgatct gtgactcttc ctttggcatt ctgtaaggag aaaatagaat 29160  
actacaccag atattcaaag catcacgttg ccagttgggt tgcattgtga ttatttgagg 29220  
actattcttg agagaatttt attcttttaa gggttggtatt taaattcatt tagatgaagt 29280  
ttaatgagaa agtatgacct ataaattgtg tactcataaa ttttgctcgt tgatttttca 29340  
gagtaaaata tttttgcttg gctaacttaa aaactgcagt tttaaaacac tgagaaagaa 29400  
gtgggtaaaa atgtcagctg gtacctatga gttagctagt tttctctata cttaccataa 29460  
attgtaataa ctaaaactaa agaattgatt atcattctgc aaaaacttaa cttaggctt 29520  
ttaatttgct ttcttaaata aaagcttaca gtatgaaaag tacatttaat attcatatga 29580  
gtggattatt acacacacat tcttggcacc ttaaaattag cagacaagtg aagtattata 29640  
aatatgtgag ttacatatat gctgaatatg ttaccttag agaatatgta acttgaaggt 29700

actatcttact gtcttcttgggt gtttttgggtc tagtggagct cagattagaa cccatgcctt 29760  
gagcctgtta ggtatacact ttacgagtta actatactcc ccgtccttgt ctgtcagttt 29820  
gaaagagttc atttaaaaaa tactgtcctg gaagtattct gtattctttg aacagttttg 29880  
gatgctaaac cgttatgtga agaggtcaca caatttcac tttgatgtaa tatgggtggg 29940  
acagtgttct cagaataatt atatcatata aggtctcagc aagtaaagtt agaaatactt 30000  
cagaattctt ttaaaattgc ttttatttat aattgtgcaa gagggaccta aaaatgagta 30060  
attggcattc tgaacactta aggattttgc aaggttttgc aggcccat aagtgagcat 30120  
atttcaggaa gatatcccca tttcagtgtg gttacagcca tgagatgcat gtacttttat 30180  
gcattgattt tatatatatt acatcttcaa atgccatacg tatttaaata tatttttagct 30240  
gattaaattg gcactgttca tttccttttc tgcttaggca aatttagcat caggtaaaaa 30300  
tcagttgtag aacattagaa agacacactg gaatgactga aagtttaata aattctgaaa 30360  
aaatgggaaa ttctggaacc atttattttt atggctatta aattgtgcca ttttcattggg 30420  
gtaaatgata tagttattag tacatgaccg tttctctccc agccaaagat ttattgcaat 30480  
ggtaggtagt tgagtattta ttaaaagatt gaattggaac aggtaacaat taatctagat 30540  
ttggaggaat ctagattttt agaaatgtaa aggaaaaaaa aacctgatca taccttcag 30600  
gatgcaaaat atgagttctc taagcctcag taaaccaga aaaaaaggca gttcacaacc 30660  
ttgaaattga agttattaac ccatttggat tagtccattt ctgtcttgtg gggttaactgt 30720  
tgattttaga gtttcaagta aaactgaaac agcagcacia ttgaactgtc cctaataaag 30780  
aaaagtcaag tctgtgggtg cagacttagt tctgtgtgtt tcaggtatat ttagcggttg 30840  
gctctgttag agagtctttt cttttggtag ctgcctcctt ccctgcaaag gtagctccat 30900  
ttggcatgat cagcaagcaa atggctaaga caatgagcag atagaaggga aagcattaat 30960  
gtctgggtat tagcagccta gttacagatt gtactgcgtc agcttgctcc acaccccaaa 31020  
gacatcaggt gactccagtt gttcagccgg gactgcaggc ttaggttgag caaacgggta 31080  
tctcatgtct cagggagaat tttgcaattt acagcttttc tgtagtatg cataatttgt 31140  
aattgctgct ggagggcaga tcgtggcaag aaatggacga tcagaagaaa cgttggaagg 31200

acaagggtat gtcctttaat cttttactcc tttttatgta accagtaaga tttctgtggg 31260  
taagctttgt agtttagata tactcgggat tgaaagcgga gcctgtgac atgtaatgct 31320  
taagattaac ataaaacagc tgcttctggt gttttttaca gttgattgtg tgcaggaaag 31380  
atatcatatt ctttttact ggtgtttggt ttagtaattt tagacgtgtc tgttgtttct 31440  
tttctaactt tgcgcggtga aattggatat ggattaacat ctcatttggt ggtcactttg 31500  
gtgtgaggaa tgtataataa acattacatt cttctgtagt ctgtgatgac atttcatgat 31560  
gactttaaat aaagctcagc tgggtgtcct gagatctatc cctaggtttg taggtagcag 31620  
aattgcattg tatctttgaa aatctaaagt gaacatttga agttcttact tgaatgcatt 31680  
ttaattttta tgtaacttga aactattcag atgtatacag agtttttaaat gtatcccca 31740  
atttactaac ctttgtcctt gtaataacca attaatgac ttgatccccg tcctccccct 31800  
tgaaaactca gattttttaa aatctcagt attcattgtg aagaatttaa gcctgcaaag 31860  
tagtagtaaa atatcgacta ttgaatattt caatagcact ttattatgta gcttgacaac 31920  
tgctatgtaa tgagagagag agagagagag agagagagag agagagagag accgagtaag 31980  
caagagtgag ttgtttatct gactgtctag aataagttgt cttaaaaatt gttagaactg 32040  
tttttaagt gctgagataa acatttctgt agctgactag ctgcagtgac ctgcttttaa 32100  
acaaaaacca aaaccaatca gtaaaaaaaaa aatgtggggg aaaggtgatt ttaacattga 32160  
attcatatgt attcaatata aaggggaaaa cagctgtgag ctttaagaaa ggatttcatt 32220  
aaaaagctta ataaaaagg acttttcttt agcttatcca taaatattaa aaatgaagtg 32280  
aaccaatgtg ctagcttttg gtaagtaaaa agatacttga gataataaag tgggtgagaa 32340  
gccacagtag ggccatcct gcaactttca agtctctgca tgaacgactt caattgtaga 32400  
gtattaaaaat gttaagctct tataagataa tgtagggata taaagacaga aattaagatg 32460  
cagtagaatc tatcttttgt gatagtctta actattaaag acccttaaag aaattcagaa 32520  
tcactcttga gtctctctgc cgatcctggc tttgtttgtt tgtaaacttg gtccactgat 32580  
acttttcttc ttgtttttta cccttgtctg agtaaatacag accaacctat ttttctta 32640  
tctaggtgct gttacatctt agtgtttcct gtatcagctg ctaatgctaa agattatata 32700

gtgaggttta aatcagaaac cactgagatg cctgaggatga atggtttttc cttactgtga 32760  
aaaagtgagg aacctaacct gaggtgtcta cacgggtaaa cttaaaatat atatacttac 32820  
ttagacctgg tccccatac ctgcattctt gtgctctcag actcccttcc caaagctgtc 32880  
agtagtaaca aatattctga ttcattgtctg gctttgtttt tgttttgggtg aagttttaaa 32940  
tgtgtttgct gtttgggtga tttttgtttt tgcttattag atatctagtc ctttaggcaa 33000  
agaggtatta taattgggtg tggtagctc ttgctatitit ctgttcatta gcagaatatt 33060  
ttgacaaatg aaatctaata tttcattatt gaggttatat ggaaaactta gattaagatg 33120  
ggaagacttg cgagtctagg tcagttgggg ggaagaatga cgtaactgtc agcagcagag 33180  
acaactacac aagtaacca gggcaacctg caagttcttt tttagacaac accacaggaa 33240  
agaatcttag gaccaaaga agaggttaac aggaagaggt gcctgggaag aaaatacagc 33300  
atactgtgct cacagttctc aaagaattgg aactagcagc aggcatgtgc attttgggtg 33360  
ctctcaaggt acatctcaaa ggattgctca gaaacttttt ctatacatga ggttagagac 33420  
tgtctgatat gatagttcct tggatgggct caaacctaata aagataaagt caggacttta 33480  
ggattgcacc aggggttagg acatgccctt ttgtttgtaa gtgggctttt gatgagattc 33540  
ctaaaaaatt acagatgtta agtatgttg aattcttgat tcttagttgg taagaggcct 33600  
caccagggga aggggctcct ttcccttccc aaccccatag tctttccttc ctttccaatc 33660  
acacctgctt tagaagcact gagaagacac tgtaataca gtgactagaa tttcctgggt 33720  
agagtagact gtataggata atgttgacag atagatttgt aggctcaaag atgatagaag 33780  
gtagacggt ctaggtcagg tttcctgaag cttctctgtg gttcacaaga aagagtcctg 33840  
tgatcctatc aaaacaagct ctacagggcc tggcaatctg gtgtcatcat tttataattg 33900  
ggcagatttg gaaaacaatc tagggttcac accttagttc tagtatgttt tgattttgac 33960  
taggtatgaa actgcctctt aagtttttat tctgttgtgt gatttatagg gttccagttt 34020  
tgaggttctc tggggtttta tgacaagatg ctctgggccca ggttgtattg gtttgatgtt 34080  
taaagtaggt agtaataata agtagtggtg gggttcagaag gccatctgtg gtgtagtaaa 34140  
agccggagga gaacctagag gcctgagttt gggatgattt tagctatgcc tggacttaaa 34200

aaagaaaacc ttgaacatca tctgaaatgg ggatgaaaag gaagtaacag atatgagaaa 34260  
aataagttaa gaaatacttg atattcatca taggttgcag gactacatga attcgaagtc 34320  
acgatgaaca actatctatg ctcagcatca gtagatTTTT ttttaaagcc aaattgagtt 34380  
ctagacactt tgaatttgaa gtgatggaca tagcaagcaa tgataaagat tacaaaacaa 34440  
atgcaaagcg agggtatctt ttttaaaaaa tcgaagatag ggaaggaaag ccattagcac 34500  
caagcctaca ttaatggagc accaggaaaa gttagctcta acagcagtag gaggagtagg 34560  
agagtgtggt ctcaccacca ggacaggact ggaggtctga ggaggactgg ctgtcaagaa 34620  
actgtttaga atgaagataa agtgattgca gacgtcaga ttttaggaga aagtgcagca 34680  
ttgccatgt ttgctagtgc cttttagat tgggaagctc agctggcctt tgtgagaact 34740  
ttcagtaaca ttaaaattca gtttgattat gcttaatgac aaagtggctt tgtcatcata 34800  
tctggtgcat tcttccttg tggactctt agggttcct actttgcctg gaagtcaact 34860  
gccaatctta ggaagaaacc tgcttttaat tctatctaaa cttacctaaa actcagtgt 34920  
acttgacct tcatttgtt tttctagatt ttttttttg attgttgta agtagcagga 34980  
ctgtgtgttg tagaaaatag agaatggctt tgggtttta ataatgaagt aaggaactag 35040  
aagattatat tatacattgt attctgtaat ctgaacaat ttagtagata tttccacctt 35100  
taaagtcact tacatcactt taatatgttg ctggttaaag tgagtaaaat taaattaaat 35160  
tctgttctta ttcattggtt ttgttcagtt aatgaaaatt ggggttaata catgcttgca 35220  
gcattgctt tcagaaaaat tgctttgagc aacgagttat tgtttgtctg ggagccatgg 35280  
ctaaaattaa ttctgatggt tttacttta ggaattttta tcagtttta gtaaattaca 35340  
gaaacagggt tgcattttt tttcagaagt gaatgtatat atgttttcag tggttataga 35400  
gaaatataat aaaaaaaaaa ctcaaggga tatggattga gaccagtggg ggaatttat 35460  
tctgatgctt tccttattta cccctatctg aatattcgta tttttttta tcaggactgc 35520  
taactgatct atacttcag tgatggctga attgaaatta tcttctcaa gaacagttgt 35580  
aattgtgcca ttgcaagagt tttctttgt gtttcaagtt caacttatac tgatgatcct 35640  
tggctaatta taaaggcatc ccatgactca gtcctagctt actcccatcc ccacagacc 35700

ctgaagggcc tgctccatca acatgcctgc tatTTTTattt ctctgatttt acctcttaca 35760  
ccttttcttc caatttttat ttTgaccatg cagtatttaa gacacattct tcccagatag 35820  
acatgatact ggccttcttt aaactcttct ttTgagttgt gacttctatt ccattacata 35880  
tgggctttat gtctgtaaca ttcttttaaag gtaaaaatgg tcctttcctc ctgggcctcc 35940  
tagttggcat gcataatttt tctataaaat gacagacata tttaatgggt tactccttgc 36000  
cttgaacttt gtacatatat ttctttttta aaatgataca tccccccac ccccatTggg 36060  
gatttaggat tctccttttt tcttaaagga gcaatgaaac aattaagact cgtaggagtt 36120  
ctgaaagata gcttagcagt tataagcact ggcttctctt gtacaggacc caggtttgat 36180  
tcccacatgg caactcaca ccatttgtaa ctccagttcc aagttccagg gtctcctaca 36240  
tcctcttctg cctcccatag gtgccagggt tacacatggT acacaaacta aatgcaggca 36300  
aaaatacaca tgtaaaagta aatacttctt aaaaagaatt ttagatttca cctgcagata 36360  
atgagtcttg tcatttacat ttattgtaac catttagttt tatacataag gaaaccaaga 36420  
aaactaaata tgctagggtta ttTgcataga ccttcaaagc tggagtatga gaccttgatt 36480  
ttatagtttg tatgagaaca accaaggagt gatgaggaaa aggctgaaaa ttggcccatg 36540  
ttTgataat ttattcatgc atagcttact atggcagctt ttTgtatgtg gtaccattta 36600  
ccacttactt tttttatttt atgtatatga gtacactata gcagtcttca aacaccccag 36660  
aagagggcat cagatcccat tacagatggT tgcgagccac catgtggttg ctgggacctc 36720  
tggaagaaca gtcagtgcc ttaactgctg agtcatctct ccagcccctg gttctcactc 36780  
ttaagaaaaa aagagcagta gtcttagtat caactgtgga aaaaggtaga tTgtggttagt 36840  
agtattactg aaacttctgc tgagcctgtg atataatttc tcttaaggac tggattccgt 36900  
actTgctgta ggaagaacat ttcaacagtc aatagaattc tctttacttt ttcttttttt 36960  
cttttctttt cttttttttt tttttaactt aatctcatct gttgctagaa ttTgggctta 37020  
agggtgttga gtttaattta gtttaattgt atgcagtctt ttataactaa tttttataac 37080  
taaaaattgt caaattttgt gcaaggagtg tttaggagta agtaagtaga tagatacata 37140  
gagagaaaat acttagcttt aatttagaat ggtattacat gtatggactt tactatgaat 37200



ggaaaattat accatggttt agagaaattg gaaatgtgaa gttaggata ttttctattc 37260  
tgtttttgta tattgatgcc cccaacatga aaatTTTTT atgtgtgtaa gtgtgtgggc 37320  
tctccatggt gcagtgtgtg tgtgaagatc ggaggatgac atctatgagt cctgtgggtc 37380  
ccaggatatca gactctgggt attcaacttg ttgtcatgtg catcagtttg ccagcccggt 37440  
ttgtattgaa agctatatga actaaataat cagtggtttg aattattaat gagtcaaattg 37500  
tggtggtagg agcttactat tcttattttt taaaaaagtt gtttttaaaa tagggcttta 37560  
aaattgaaac ctgacttcaa gctaacttca ggctaagttg aatgtaaatt taaggaaatt 37620  
catttaagga aatgtaca ggatgacttg tgcattgaac acatttgatc tagcactatt 37680  
tttagctata gcagatgaca gcctgtgatt accaaatgta ggcagctctt ctttctttgt 37740  
accaagtcag tgaaagaaaa actgggttcc tttaaattta aatttttagtt aggtaaggtg 37800  
cactatacaa aataatcaaa agttttctat attttttaat ttgaaaaca aagataaact 37860  
gcagggaaat gaattctatt ttctaaatta tttaactaga ttggcataaa cccctatgtg 37920  
tttcccatag ttgtaaggga aaaatcactg ttcagttctt cttggatctt taaaaggggt 37980  
gttctatgaa cattttatat gagttagaaa cttccttata aaaacatgct ttatccaata 38040  
ttttcataag aatttcctgc atgtgagtgt gctgcctgcc tgggtatgtg tgtatcacac 38100  
gtctgcctgg tgcccatagt ggccagtaga ggagctagtc ccctgaactt catttacaca 38160  
ttgttgtaaa tcacagtggg gtgatagaaa tcaaacctgt gtgtttctaa aagagccttc 38220  
tctctagcac ccctatcag atatttactt tgtatttcct cccattttgt agattgtctt 38280  
caccttcttc attatgtcct ttgaaacaaa atattttatt ttaagaggct cagtatattt 38340  
acttttcttg tgtttatgct aataccatat gttaagaaac acagccttga agatctacac 38400  
tttctttatt cttttaacta aattgttatt tttaacagct acccttcatg taaacatgtg 38460  
taggaatgtg tatagaggtc aaaagacagc ttataggac taattcttgc cttctaccat 38520  
gtggggctag gagctaaaat gtcttagcaa gcttgggtggc aggtgcactc agccattttg 38580  
ccaactgtct aaaagcattt tatagtttaa actccaatct ttagattttt attctatttt 38640  
gagttaaaac aatattttgt catctttaat agtgtgtttg tcatgaatgc agatagctac 38700

tgtggctaga gtggtcagat cctctggagc tgaagttaa gagatttggg aaccattaat 38760  
ggctgagcca tctctctacc ccataagtta acctttcatg tcatataaag tacaggaatc 38820  
taaggagtcc agtggcattc ccctgcagtt ggacatccag ttgttcttag cttccttgtc 38880  
aaattcacct gactataaat ataaaagttg attgtatttc acttatgttc ctttgaacc 38940  
atgtatatga ctgtagggtc gggtttatgt tttgttttct ttttttgaga cagaagcttg 39000  
ctatgtagct ccaactgact tctagcttgc cattctcttg ttactgaaag ctttgcagga 39060  
aattttgcag aggagaaatg tgagcccttt aactttatta ttgttttcca ggatttcttt 39120  
ggttattcca gatataat ttttcagctg tcttgtcagt tcagttggag acacaagctg 39180  
ggcttttgtt ttgatggggg ttgtacttgg gactaattag aggactgtta tatgtcatcc 39240  
aagactgtgt gatatctttc tgcttgattc agccattaat ttcttttaac tgtaagtttt 39300  
cggtttat ttttctttt cagctatgta tgcttctagg aattaaattt ttttgtttgt 39360  
gaatgttaac tgttgttttg aaagtctgtg ttaagtcaga tgcagttggc tttgtatgat 39420  
gttgtaacca caatgtcact agacttgttt aggaattcta gttgctgttt tgtggcttct 39480  
ttaggaaatt ctaaataata gatcatatta gcaacaaata ccttaattta tttttgtcca 39540  
atcaattcat tgcccaaatt ctgggtcaaaa acttctagga catatatggg tgtgaagtgt 39600  
caaagagagg ttacccttgt cttattacta ggtttaagt ggaagatgct agtcttgcag 39660  
catgttcact gtgattttgt agattttatt tttgatcagt ttgaggctaa ttcttttttt 39720  
ttttcttgct gttttgttga ctgtttacca tgagatgatg ttggacctaa tcagtttttt 39780  
atgcaactat tgtggcgagt gtgtcttatt cctattttgt ttttatggtg catgtgtggg 39840  
ttgttattca tatgttgac tacctttgca ttctcagaac agatcctcct aagctatgct 39900  
gtaatctgtt tgcatgac gattttgact tgtaaatggg gttatgggtga aatcactgtt 39960  
ctgtatttat acgggatgtt tatctgtact tctctgatg tctttgtctg atttgggtat 40020  
ctgaattgaa caatcttcta aattaactaa tgatataagg ctctgatgag ttatcagagg 40080  
catgtagata tttctttgga tttttgtatc cttttttccc cccatggaga atcactgctc 40140  
ttgggcgaat ttaatcttcc taatttaaaa aaaaagtaaa accaacataa agagtccata 40200

tgaactaaa atacttttga caagtatgaa aacagacaac tgtttttgct agaaatttgt 40260  
gtttttcttc ttgcagctt cactgacaaa ctctttacaa aatgggattg aaaatgtatt 40320  
agtgcctgtc acagtgcctt ggacgatgga ttctgtcctg tgtgtactta cttaccactg 40380  
ttagctgtc tcacctcctg cctgtacttc cctaattggc tcaagagtat ctcaacttct 40440  
gcattcctag gacttacttc agcttgacta atccatagtg tgtgctttga ggtagtcatg 40500  
tgttttcatg tggatatgtt gaactttcat gtatgacttc cagagttctt acaattattg 40560  
acaagatctg actgcatctg atcatttatt aaattatcag gcagcattgt tctttgtgtg 40620  
tatgagtgtg tatgtctctg cacatactgg tatgtggata tggaggctct aaggcagcct 40680  
tgagtggagg tacagagaca ggatctctta ttggcctgga gctggcatat gagttggcct 40740  
tttgccaat gagccctaga atctgcctct ctctgctttc ctgacatgag gattacaagt 40800  
gttggccatt gtgctggcct ttatgtgttt gggggtttgt aggtccctgt accaactgag 40860  
ttgcttcccc agtccgttgt gttcttatag taggaaatcc tactctacca ctcatgaat 40920  
ggggattaag gcagtatttt gtgattataa attgtggttg ccactagcat gagactgttt 40980  
caagtagcac agaatgtat aaagaaacag gtaagactta tctataatcc caatattaaa 41040  
gaagtaaaaa tatttagtag atttttttca gacttaatgg ttagacatat tttgtttgt 41100  
ttgtttgtt ttatatgtag cccaaaatgg tttcaaattc actgtttag cccaggctgg 41160  
ctttgttctc ttgattcttt taatactctg ttttcaagtg tcattatagg catctttatc 41220  
tttctttaca gaccagtttt tccattatac gtatactagt tttaatcaaa ttcatactac 41280  
ttttaaaagg tattttcaaa aacttgatgg gacagtgaga tagctcagtg ggtaaaggta 41340  
cgtggcaccg agtctgacct cctgaattca atccctggaa cccacatggt atagaaaaga 41400  
actgactccc acaagtatct cctgattgcc acacatgtac cgtgggtatgc gcatgctcac 41460  
ttcattcaca agtacctgaa aagtactgt ttaaaaacct aattatactt tttggctct 41520  
gagaagtact tgttaaataa atgtattgct cttagctgcc ctgtcattgg tgtgtaaatg 41580  
taggtatcta tgctggctag tatatgtcaa cttacacaa gctagagtca tgtgagagga 41640  
gagaccctca attgaggaat tacttctttc tataagattg tctgcagagc attttctcac 41700

gtagtgattc atgggagagt gccagatca tttgggtgat gctatccctg agcttctggc 41760  
cctgggttct ataagaaagc aggctgagca agccatggcg agtatgccag taagtagcac 41820  
ccactccatg gtttctatat cagcttctag tttcagtttc ctgccttatt tgaattcctg 41880  
tcctgactta cttcaatgat ggtctataat gtgaaagtat aagtcaaata agccctttcc 41940  
tccccaacat gcttttggtc atgggtgttc accitagcaa tagaaatcct aactaggaca 42000  
atatcctata tcttgtaat ttcacataga cattcttctt ggtctttgtg gttcatttta 42060  
catacaatga ctcttagtct atgttctgcc cattcatcaa acatgcagat gtacaacaat 42120  
ctgaagaact tgaatatgct gaccctttag tttatgcaca gggtgcttta acaatagcaa 42180  
gtctcattat atatttatca ccttccactt ctaaactgta aaaagctttt tgtacagttt 42240  
ttgggtgttct cataattaca gttatgtaca attgcttgaa aagtgatatg attaggtact 42300  
tactgatttc atgaagtta tgtttggcac atagtaatgt ttttgagaag gttcagttta 42360  
aaacacttaa gcctcttata ctcagaagta tacatcttaa aaggagatct attttaaagt 42420  
tgcagcaagg cataggctaa tgccaatagt aaaagtttat tgattaggac ccactaataa 42480  
taatttgagt gtaggacttt gtattaagta ttaatcatgt tagcctctga agggaaaata 42540  
aattggaaga cttactttgt tgaagataaa acttaagtca agggaggttc aagtctcact 42600  
ttaagttaca cagttgcaga gctagtacca ggagggtgggt ctctgaactt agcctcttct 42660  
ttctactata ttcactagta tagaacctgt agattaatta aatcttgagt aatcaaaacc 42720  
tttgaatttt ctctggtttt tacacatgga cacagacact tggaaagatc agttttaatg 42780  
taacagtgtt ggatgctctt aatgaagcac ggtgagtgca cgtgcattta tttgataatc 42840  
ttaccagtag ggatactaca aatgaacaaa tggctttgag tgctttgaga ccactcatct 42900  
ttatatgagt attttgctat aaattggaag aaaagtccgc tgattgttca gttctgggtt 42960  
ggtgttatct taaaatgtat tattgtgtat atgtatttag gcatgattgt gtggagggtca 43020  
gagggtcaat ttaacatttg ctttcttcca cttgagtttc agggaatcat tagcaagtac 43080  
ttttccatt tattttccct gtgtgggggtt ttgtttgttt gtttgttttt ttcgagacag 43140  
ggtttctctg tgtagcccta gctgtcctgg aactcactct gtagaccagg ctagcctcga 43200

actcagaaat ctgcctccca agtgttgga ttaaaggcat gtgccaccac tgcctggctt 43260  
ctgtgtggtt tttaaagtga catgtttctg tgtaacatca tagttcaggt caataacttt 43320  
atataatgtt gaagttatcc cttttaagta cctagaaata aagggtgattt atttgggggg 43380  
gggcaatatt agtaacacaa ctaataatcc tgagtcctat attaaatact ttaacttattc 43440  
attttattga tagaaaaatc tcaattcatt ttcctcattt aatgaatccc atctcagtga 43500  
gacaattcct atttttatat atagttaa atgagtgcta gaagcgtaga agggtttggc 43560  
aacttgcctg aggttacatt gttagtaatt ttgtgcttct gttggagtct aggtcaccta 43620  
gctctagagc ttgactctg ggcttatata acccactgtt agagcacaca agggaatctg 43680  
acaggaatta tgctgccact gctgtctatg tcatgtcact cactaccctc actaccttcc 43740  
ttgcattccc aacagggaaa gatgacatta ttagcttcgg gtagatgtga gtcctgccag 43800  
tttcctgac tttttttttt ttttttaa atgagtacac tgactcttct cttcagacta 43860  
cactctcttc agacacacca gaagagggca tcagatccca gtaaagatgg ttgagccacc 43920  
atgtggttgc tgggaattga actcgggacc tctggaagag caaccagttt cttactgct 43980  
gaaccatctc tccaaacccc tggcttctta atggcagctg gattcctctg tttcagagtt 44040  
tttaaatttc tttcagcgtc ttttacctcc cacccttgat ttcctagtagt agtgtaatat 44100  
ttactttaaa actttactga gtgttctaaa tcaggtagtc cttgaaaaga tatacttttag 44160  
catttttagaa ttgaaaagag ccttaaaagt acatttccca gctttctgct catttcacta 44220  
ggctgacttt ctgtttttgt tttatgatct tgttatatat acctggctgg cctggcattt 44280  
gctgctttta gtctggttag cctaaaacgt gcaacactca tgctcagtct ctcaggtgct 44340  
agaatgccat catacctagc tcaatgtgag aaaactattg atatgtctgt gatctctttg 44400  
ttgactgcga tgttatttac agtatcgttt tgacagcaca gattaggcta tttcaaggctc 44460  
tggtcagtcc tcagatgcat tggtaggaac aagttgcaca catcagaact gatgtaggtg 44520  
ttaatagatg gaggttaaga tcatagtgtg aaagcaatca gtgaaacagg ctgtgggtca 44580  
tacatggaat ggatctggcc caggatatgc acatgctagg catatacact ccaagcccca 44640  
cttactaagt gcttaatata tatactccaa aggtggaatt aaacctttgt aataatactt 44700

● agtgttttat agcttacgta atttttctta caatgtactt tcagtgctaa atggaagcca 44760  
tgctcattta ggatcctggg gatcaaaacc aatgcatccc tttgaagtgt gactttttaa 44820  
aatgttactc cttttatctt aaagttagca ggagttctac ttgagtagtt ccctatttgt 44880  
tttaccataa agtgtgtgga gtttttgttt tgttttgctg ctcttggttg gtcaccatct 44940  
agagagggtga atactgtgta gtgtgtcaaa gagtccttcc ttcagtgcac tgttgaggat 45000  
aatctcaaga gactacaagc ctgtggttat ttgagccttg cagtagcttt gtttccagtg 45060  
gccaaaagca gacatggtaa attgtctttg tctgactcta taccaaatgg tatggaatat 45120  
tgtagtatgt aagattgggg gagtgtcttg tttgtttgac agcttttgtt ttttgacccc 45180  
tgcagttttt atgacttttt tcttctgttg aaggaaatta gttttttaga tgtctgaatg 45240  
ctgttcccc tttatctttt attgtaggta acttcagtta gtactaggct aagatatcat 45300  
tttaggattt tcaaaggaga gcttctaaaa gccaaagtgt aaatcttagg tgctcagctg 45360  
ctaacatttc aatttttcac ctttttttc tatagatttt tattttattc tttttgtttt 45420  
aattaaatca tttagttaca tattttatgt atatgagtac aatgttactg tcttcaggca 45480  
caccagaaga gggcattgga tctcattaca gatggttgcg agccaccatg tggttgctgg 45540  
gacttgaact caggacctct gctcttaacc attgaacat ctctctagcc cttcaacttt 45600  
ttaaaaaatt tgatttccta tacttatgtc ttacaatagt ctttttcgta tgtactattt 45660  
ccctgtaatt tgaatatcat gcatagtatg aagaagaaat gtctcaagat aattttaagt 45720  
gagctctgcc aggcctaaga agtatataag ggtaatttgt agctagaatg atttggtcac 45780  
tcaggaggga ggttgGCCa aaagaaggaa aagtacaaac ttagcatttc actgataggt 45840  
agcttatact gggtttaatg ttttagtgtg tttcctccgt gaagaacatg taaatgtgct 45900  
aaatccaaat ggtaagata gtattctaatt ttcagacttc ttcttttaatt ttttagttgt 45960  
tgacctcttg tactggagag acattaagaa gactggagtg gtgtttggtg ccagcttatt 46020  
cctgctgctg tctctgacag tgttcagcat tgtcagtgtg acggcctaca ttgccttggc 46080  
cctgctctct gtgactatca gctttaggat atataagggt gtgatccaag ctatccagaa 46140  
atcagatgaa ggccacccat tcaggtgaga tgtttgaaaa atgaggcaac agtgtaacta 46200

ggattggtag tgagacttca tctcctatct gtagaattat agtttgtgtga tttctttgtt 46260  
gcttagagat aatctatcaa gaacatatct gcctttgaga tttcttatgg tagaaaagac 46320  
tgggctcatt agtatattata gtagatattg gttatcacag tgaatttttag aattggtgaa 46380  
gttatattgt tcttactgtt tacatttaat actatctaata actatataacc tttccctag 46440  
tatatgttct tacctacatt tgcttcagtt tctcagggtt ttatacagag agaggagata 46500  
acttcaaatt gaagcttcaa aatgacaatt atatgccatg aactattgac aaataggatt 46560  
ttaaagcagt tgtaatgaaa tacatgaaaa tgttacaaag ttctaattta tccacagtat 46620  
tagttttata tatcatttag ttttaaagaa ttttgaaga ctgccagttt cttttttttt 46680  
tttttttaa tatttcttt tagacatacc ttttcataa aggcatttac agtcttttac 46740  
aaattcagct gacgtgccag tttaggcctg gtgaacagct tttcagttgc ctagtcatac 46800  
tggtgcagtt gaaattatac agtggtgaaga gggaacagtg atgagcagca tgtaaaaatt 46860  
tgtcatacaa atgtctacca ggtggcactg atgcaggatg ctctcaaaga acaagccagg 46920  
ttttttttt tttttatatt tctaggaatt gtatagacag ggctcagaag atggctttgt 46980  
gggtaagact tgtggaaca ggagggccag agtaccacat aaaactggtc actgctatat 47040  
ggatgtctat aacccaaatg ttggaagtca gcaacaagta aatcctggga actcactggc 47100  
cagctttgcc aaaaataatg gacttcacgt ggccccacat atacacatta aaaaaaatg 47160  
cataagtaac ttcttgctgg ttgaaagt gatgggaaac ttgggatgtt ttaatttgat 47220  
atttatgaat aacattggta taccagtatc tcctgctgtt gtaaagaagt ggtctaaata 47280  
gtctgccaac gtggggaact atgctgtctg cattcagagc tggatgtagc acttaataat 47340  
gtggaagagg acataaatca caccgggctc tgcggactca gctctgacca gtcttcatgt 47400  
gtgggtgggg tctgaggtga ggctagtcca cgggataagt tgttatcaca ggaagaagtg 47460  
accttcgctt taggaaagaa aatagtgtga cgaccaaggc attatggttt aaaaaatgtt 47520  
ttaaatgat tcataactta tttctagctt taacataggg agcagtggga aggtgaccaa 47580  
aattaggtat gctctctgat ggaatcagag taatacattg cttgaagtgg acatgattcg 47640  
tcacttaatc tatagagttg gaaacttgac tcagagaatt gaaatgcttt ttttgcaagc 47700

ttacttagct agaaaatagc caatcttcta atgcttacct gagcttaacc tactctgcta 47760  
ttttaggaag ctacagatagg ctaatctggt gttgatgcag agaaaacagg cttgcacact 47820  
gatagagtat ctacagtgtgc aaataataac agatacttaa ctaacaagag tgagtgatca 47880  
ggaggcacat ttggggccata ctgcaaaggt agtagtggag atagggttgt ctacagaggac 47940  
actgtgctag gaaataatag gattagttag gtatggtgaa tgtcatcttt gaaataatca 48000  
aatgatcatc cccaaattgt tatcttggtta aatttaacac ttcccacaca ctatagcata 48060  
caagagagca tgaaaataga gagtaaatat taccctttat ttatttggtat tgccactgta 48120  
ctttaagcag ctattttaca tgctaataatt taacatttga cttttttcca taaagtgaat 48180  
atggaaatga gtaggatctt tggtagcaga tcctaataag actcagaaaa taattttctg 48240  
agtgatctgg aggccaagtg tcattaaaca ttttactcat taaatcctca tgattaacgt 48300  
ccatttaaaa tgagaaaaca gttttagaag attaaatttg cacacttaga ttactaagaa 48360  
aatgatagca gttaaaattt aaaatgtctt taaaacacgc ttctatcagc ttggggggtt 48420  
tggttttggt ttattttggt tgagatattt ctgtagccaa agttgggttt acactagtaa 48480  
caatccttct gacttagcct ctcaagtgtc gggattacac gcatgaacca ccacagccag 48540  
cttactttgg atttttataa taagtgtagg cttttatagt agattgttct acactgttaa 48600  
tctcttttat agatctgtga ttgctgattg acatgtgaga atcagtgtca gttgaggatt 48660  
ttttcttttt ttcttttttt aaagggcata tttggaatct gaagttgcca tatcagagga 48720  
attggttcag aaatatagta attctgtctt tggatcatgtg aacagcacia taaaagaatt 48780  
gaggcgtctc ttcttagttg atgatttagt tgattccctg aaggtaagtt tattttgctt 48840  
ttcatttaca tgtatcagac agattggcaa tataaaattc tattttctct atccaaataa 48900  
atcataaaga tgaaatgaaa tcatatcaat gtaaatttag gtttgaaaac tcagtgtcct 48960  
gtgttttagat ttgtgtgaga actatagttt gacacttttc tccttcaggg aatactttta 49020  
gaaagagaaa ttgagaagaa aattttgctt ttgattgtgg gtttaaaact caaaactcaa 49080  
gaaaagtggg ttgattctgt cttcggtatg aagttcatgc ttcacatgt cagcatcga 49140  
agtgaacca aataggtctc atagtgtact tcggcaaaaa agtatccaag gagctaaaga 49200



gatctgcaac cctataggtg gaacaacatt atgaactaag cagtaccccg gagctcttga 49260  
ctctagctgc atatgtatca aaagatggcc tagtcggcca tctactggaaa gagaggccca 49320  
ctggacaggc aaactatatg ccccagtaca ggggaacgcc agggccaaaa aatgggagtg 49380  
ggtgggtagg ggagtggggg ggagggtgtg ggggactttt gggatagcat tggaaatgta 49440  
aacgaggaaa atacctaata aaaaaaaaaa gagtaaggca gaatgttttc ctttagaggc 49500  
gacaggtaat aaacacttca tcatttaggt gacactctac agggaagggt cttcctgggt 49560  
gaatggggct ccactacatg agactgcttt cagcatgtat atgggtatca cagattccag 49620  
ttgtttatga gtccaggata tttgtcttaa aattcaccaa aaatgtaagc agtcctcaag 49680  
tggttgtggg cgaggcatga tgacacatgc ctttaatttc accactcaga gagcaaagtc 49740  
aggggggctc tctgagaggt caaggtagg tcaaagtctt ggtatcaaat aaaataaata 49800  
aaaatagatt gtagcactca agagtctgag tgaagtttta caggtagtat tgcctttcta 49860  
aagagagttc ctgcatgtta actttatatg tgtggttgtg tttatctatc atagtttttg 49920  
tttctatgga aaagcaatgg tgttccttct gggaatggac tcctaatttg aatttttttt 49980  
aaaggtgcta tgagcttttg actggaattg ctttgatttc tagttaataa aatggaaaca 50040  
ttttaatttc tagaaaacaa attgacataa tagacaaact ctgtagcttt gacaacagtt 50100  
tttaaagaaa catttgcaag cagtttatct catacattat cagctctctt aggtgtcctc 50160  
agtttataga atggtagatt ctaggtccca gtatcactta catttgaaac ctctgtaaata 50220  
atttgagtca ctcttgcaaa cacaatgcag caaccctcc cctgttccta ctccctttta 50280  
acttcctttc ttctttccct ccagaatgag ggaagagttt ctttgcgttg tcatcaaaga 50340  
aataacagat tccagggtc tgccttcagt cagcacctga gatgaactga ccacatgaat 50400  
gtacctgggt tattcctgggt agttgacttg ggcaaatgaa aataggatat attgtcacia 50460  
gttctgtact aacttcctgt ctgcttgctt cctttgtttt gctcctctga aataaaattt 50520  
aagattttta atcctagaca agatttcaag tatcatctat aaagtaatca attatccatt 50580  
ttcctatttt atgggccaag tcagtcacct ttgaaataat tcttgatcca ttgagaaagt 50640  
agcttagaca ttaaatactg tctacgtttt agggctattt attcagtttt aacacattgg 50700

gtcttaagat gggcgggtggt attataggca gaggaaagta gatctctgag ttagagtgct 50760  
gcccagtcta gggtaagttc caggacagcc agagctgtac agagaaaccc tgtcttgaaa 50820  
aactaaaagc aaaaacaaaa aacaaacaaa aaaccccagc aaaaccaaac aaaataccga 50880  
gaaaacattg ggtcttccac tgctgcagca ttgcccaggc tggctctgag caccacagat 50940  
gggtagtaca agtatcacct ggtgctgtga tagggatggt tcttatttgg ctaaggatta 51000  
agtaagtatt tttgtgatta atctgtgtaa ggatctttgg tgaggactct tgttctaaaa 51060  
agcagttttc attcatggct gcacattgga gtcaagtgag gaggtatatt ttatataaat 51120  
ttatctggga aagtgaagga actggagttt ccattccctg aaggctctgat ttaatttatc 51180  
tgagaacatt gaatgggtga tgactgtttt agaaagctat ggcataaccc tatttgtccc 51240  
tacctccagc ctgaccgtct gtcctcccc tccctcttcc ctccctccct ccctccctcc 51300  
ctccctccct ccctcccttc ctaaagtat atcatacctt ttgggggtcat ctttggcacc 51360  
cctagagaga agcttgaagc tttaacggga aagctcctac cttgtaagcc aggaatgtgc 51420  
acacaaatcc tctccctcgc ccccatgta tgtttgtgta tggagggaac gcattcttgg 51480  
atacttagga ggctgaggct gggaaccact tgaagccaga ttaacactac catctccaaa 51540  
aagttgggat cttgcccgtt gaaacaccaa gtccaaaaat ttcactaat agggactaag 51600  
actgggcaat tttagttagt tcttatgtat gcctgtagca aggcattggg tgctaaagac 51660  
tagattttat atgatagtag atctctgact tttagtgaat aattgttcta gttgaagttg 51720  
cctgatatgc aattatgttt taggatatga ttttttcttt ttattgggtc tttggtcaca 51780  
tcatataccc cagttccact gatttccctg ccctctggcc ttgcaaattt ctttccaaaa 51840  
taaaatttaa aataaaacaa agcatagaaa acatctcact gtgaaagcca tagcgtgccc 51900  
cacagtatac cttttgttcc ttacatcttt acttgcaaat gctcatttca gtgagtcatt 51960  
gcagctttgg atctgcagga ccagccctgt caagtgtcc atcaggctcat tgaggaggtc 52020  
aatTTTggag tgggccaact cagagcccta gttctgggct tgagtgatgt ctgagctggg 52080  
ctgttggccg ggtgagctct ctagcacctg caccaatagg gcaagctctt cagcattctc 52140  
ccagctagct caccagtggt tgtaactggg gaggagcaga gccaaactctc ctgctctcgt 52200

gaccctgggg tcagctcttc tgactgctat aggttgtgag aaggtggagg gcatcactcc 52260  
agtgcccaag gcacctcatg gcaggcaagt ggtggggcta gctcttcagc actcatgccc 52320  
tcaggtaggc tcacccacag ccagggccag ctctactgta ccttacctaa gtgaggtaca 52380  
gagcctcagg atataatctt aagtctgggc agagggtcct gcactctaaa aatagctgat 52440  
gcaaaagaac attcaaaggc tcttatgctg ctgtgttaac atgtacattt cagtatgtat 52500  
gttttctgac atgtttcgtt gacttagaaa aaaattgaag gaaaatgtag aaacagtcaa 52560  
gggaatacta gaaaatgggt taatgtttct agaaaaggta aaataataat tttcattgtt 52620  
ttcaagtttt taagtagcca aaattgtcaa agtatctgaa aatctattgt gtgcccctct 52680  
attttcctta aatatgtgtc tttcaccaa taaagctcta cagagttttt aataaggcgt 52740  
gtttaaactt tattccctta tactcgtgga gaaaaggcaa tgccctctcc ccatgtgtat 52800  
tgcatttcca tacacttggc ttgttgcagt cctagtactg tcaatagaga acatgacaga 52860  
caagcttggt ctcagacact ggccatagct gagaaatcct tttcagagat ctacaccag 52920  
gcataacctt gatttgtgac ttagatgaag aaaaaacttt cagggtgagg tgataggaag 52980  
tacaatttat taaaattaag gccaaagtggc cagaaaggaa gtgctttctt ttctcccatt 53040  
gttgaaagct agaccgtgac tagaagtaga agggcagtgt gtccttcctt cccatgctct 53100  
ctgttctgag ggaaggcagt tctgctctat catggcttct aaagaaagtg aatcaactcc 53160  
catttttgggt ccttaggttt ctgaagtaag acaataaata aagactgact ttactgggtt 53220  
ttcaaggctt gtgcctgtta gactggcatt taaatgtata tgtttcagaa gaaagtttaa 53280  
ttttgcttat catgggctct tgtttgatta cagtttgcag tgttgatgtg ggtatttact 53340  
tacgttgggtg ccttgttcaa tggtttgaca ctactgattt taggtaagtc tacaaaaaga 53400  
ttgacaagca cttagggaca tttttagaga atatctttat tgtaagaaaa aaaaataaaa 53460  
atgtgagatt gggagatgtt taagtagctg atactgtttt attgaaatgc tatgttagct 53520  
cctgaagact actccagcta acagctgcct taggtgcact cttgagctta aattggggaa 53580  
gctgtatttt atagaatctc tgtgatgtga tttgaagcta agcatggttc cttcagcaca 53640  
tgcaggagaa tgtgagcatt tcccaggcct caggagaatg tcaacattta tgtaggcttt 53700

aagagtactg tctggttacc ttgattacta ttggcttgat agtatgatgt tgactcctag 53760  
aatggtacca gtcttctttt tttttttttt tttttttaat ttatttttaa agctctgtgt 53820  
ttactttttc agctctgac tcactcttca gtattcctgt tatatatgaa cggcatcagg 53880  
taatttctta actgtggaga ttgcagaata tagagctcac tcttattata aaggacttag 53940  
agctagtctt tagtttggtg gtatgtagta ctgattgata ttctttggca atattaattt 54000  
tataatgctt ttatcctctt ttctcaggcg cagatagatc attatctagg acttgcaaac 54060  
aagagcgtta aggatgccat ggccaagtga gtatgccctg cagccttctt accaagggcg 54120  
agaccatcat ccggcagtgt ccttctgagg ccagcattaa ctctttttta tgcttttttt 54180  
taaaaaacat taggcaaagg tggaaaatta gtttgtattt tggtagcttt atgattctct 54240  
aaataatata cagcataacg ttttttaaag aagtgggaaa caaacacaaa atttgacatt 54300  
tttctttttt catttgtaga atccaagcaa aaatccctgg attgaagcgc aaagcagaat 54360  
gaaaaggccc caaacagtag acattcatct ttaaagggga cactcccttg gttacgggggt 54420  
gggcgggtca ggggtgagcc ctgggtggcc gtgcagtttc agttattttt agcagtgcac 54480  
tgtttgagga aaaattacct gtcttgactt cctgtgttta tcatcttaag tattgtaagc 54540  
tgctgtgtat ggatctcatt gtagtcatac ttgttttccc cagatgaggc acttggtgaa 54600  
taaaggatgc tgggaaaact gtgtgttata ttctgttgca ggtagtctgg ctgtatttgg 54660  
aaagttgcaa agaaggtaga tttgggggca ggaaaaacaa cccttttcac agtgtactgt 54720  
gtttggttgg tgtaaaactg atgcagattt ttctgaaatg agatgttttag atgagcatac 54780  
tactaaagca gagtggaaaa atctgtcttt atggtatgtt ctaggtgtat tgtgatttac 54840  
tgtagattg ccaatataag taaatataga cataatctat atatagtgtt tcacaaagct 54900  
tagatcttta accttgcagc tgccccacag tgcttgacct ctgagtcatt ggttatacag 54960  
tgtagtccca agcacataaa ctaggaagag aatgtatttg taggagcgct accacctgtt 55020  
ttcaagagaa catagaactc caacgtaacc gtcatttcaa agatttactg tatgtatagt 55080  
tgattttgtg gactgaattt aatgcttcca aatgtttgca gttaccaaac attgttatgc 55140  
aagaaatcat aaaatgaaga cttataccat tgtgtttaag ctgtattgaa ttatctgtgg 55200

aatgcattgt gaactgtaaa gcaaagtatc aataaagctt atagacttaa aacctttgtg 55260  
tttagtgttt tagtttcatg aatgcacagc aaaaacacgg tggtaggctt agagagtgga 55320  
cacatggtaa catgctttta gaaaggtttt agttcatgaa acagcttaag aacaaagaat 55380  
atatttacat agtgagattt atttgactca taacaaaagg ttttaaatta ttttatactt 55440  
tgaaaataaa ttcattgcacc aatattttta cagaatacag tgcaagattt atgaatatac 55500  
ataaaattac accatataaa ttttacaat aagactttca aagtctttat aacagacact 55560  
attgctcttc aaatatatac atatactatt gattagtcag ttgttcatcc acatggttac 55620  
ttaatgcaag atctgtctga atgaaatgtc agtagtaca gacaggcaga cacagtgatc 55680  
actcagcatc accagggtaca gaaaacagaa tcagggtctc atagggtctt actgaggacc 55740  
cagcaacctg ctagtgggtt gatgtaaggc attaataagt tggcgtgtaa aatagcttaa 55800  
tgtgtaatct aattctttta gaatgctgaa gcacttctgt ggtaaattgt gataatctat 55860  
tctttaactg aaaatgctta tttcaacctt tctctaaaat ggcaacttca tataactaga 55920  
aactcaaggt ctagaatttt agtgcacaga ctggaaggac tcgggtggtg gtgtactcac 55980  
gactccaact cccatcagcc ttcttaacta atagtcgtca agtcacattc tgtccgacaa 56040  
ctgactggag aaactcaa atctccttaca gtggggaata tgttcaagag gtttttaaaa 56100  
atctgaattt accctgcatt aatcatctga aatgagcaga gccaaagccag tcctacccaa 56160  
gagggtgtaa actaaacagc aagacagctc actcgtcaca ctggagcttt ccctgctttc 56220  
cgtgttgcta ctttctgtgg agctggactc ttctttgtg ctacacttat aactgctttc 56280  
ctagagcagg acatagtggg gaatttgcta atcccatagc cctcctcagt tttgaagttt 56340  
tagcaccatg tgaaggaaga agacgacatg ggaggtgagg cagcagccca cacaactggg 56400  
aactttgaag gcacttaatg gatataaaac tgcaaatgaa acttttaaaa attaacattt 56460  
taaaacttgt ttatacatgg ctcatctagt tttgaaagct aatgtggca aacagggtat 56520  
ttctgtactt aagtgttcc aacttacatt gtgtccagt aacattctta aaatacatag 56580  
aaacagaata gcaaacacc tttgtaaaag tcttaatgca aattaaacgc tacatattgg 56640  
ttagggtaat tgaggatgta aattttatct gtgggtctaca tcatcccaat tttgccgtta 56700

gtgaagttac aataagtata ggttttagtc tccagaacag aagcaaacag tcttagtatt 56760  
cattcttggc atcaccatct tgcaaagttc agattatgag agtcctacaa catctctgtt 56820  
cagagcttgt gtgtcccaca gcagttggcg tcgaggaggt gccctgcac tgcctacaag 56880  
tagcttggga gaagcagcca tagtgcacgg ggttccagtg ttacagaca tcgccacaca 56940  
aatacactga aaggcaaacg acatttttgt gtggtcagat actataatgc tgccaagtgt 57000  
tccagactga aaagtgtaaa ccattgcag cctactctcc ttccccgtca tcacttgggc 57060  
tttttttgtt tttttttaag gttttttttt ggggggggtt ggggtgaataa ggttttacta 57120  
tgtagtctga ggattataga tgtgagccac catgtctggt ttactgttct tttttggaac 57180  
agttctttga tgtgtgtctc ccttagactc cttttgtgc tttgagcatt tgtgcataat 57240  
gaagtcactg gagacttggc agcccaacct cacactatct gtcctgtgac tattgaagag 57300  
ggttgagtgt gtttgaatgg agcccttttt acatgttata caccatgtcc tcaaggcctt 57360  
atgcttttaa gttactttaa gtcttgtttg taaacagaag tcactttgta ttccctgcac 57420  
tgggctggcc agttcgttta ggccttttct tccaacttg ttctgtttgg ctggtactgt 57480  
ttggaatgaa tgttcattat tccaaaggaa ctggtgtaag taagtactac cccaagcaat 57540  
aatccccgca atagctagca cagtgcctg gaggtggctc agcaggcagg ccatcacggc 57600  
gcactgtgtt ctttataggt gcctctctta caatttgact cagatcacta aaaacatcaa 57660  
aatattttg taatagttaa aaattaattt tgtgcctgta cacatacacg tgcaagctca 57720  
atttcaaggg tgggttctct gcactcaggt tatcaggctt gctagaccg ttttactttt 57780  
tcagctaccc ctgagttttt attaaacaaa aacaatatit ggtaatgtaa taaaaccttt 57840  
aaatatattg aaattgagtt atagaatgac ctggtcctgt cctctccata tgctaggaaa 57900  
ccctctccta cctcagaaag aggcttgcag acctatgggt taggttgga gggttccttc 57960  
cttctaaaac aatggcttcc aaaccatgct tcaggccaaa taacctgcat atttcacctg 58020  
acggccaaaa gctgccttgg ctctttgtcc aaatagctcc ttggacttgg gccatggact 58080  
ggccctaaga ctgagcatct cccgtttctc atggcaactc atttgctcc actatttctt 58140  
agtgtcacta aaggctccat gttattagca tctttaaact taagaagatg ttattagcat 58200

cattaagcta ggctggcaat tctcaaggac aaatgggtga aggttgattt aacctgattc 58260  
tcagtgattg tttctactaa agttagccat tccagatttc ttaccctgtg cctctcgccc 58320  
cccagcaatg tttagctgtc atagaacctg agctcagcca atcccaggag agccctagag 58380  
gggacacggg cctgccaaaa tttgttgaga acgccaacaa cagaatatgg taggaaattt 58440  
ttggttttcc cctaaaaact cgtgaaattt ctttcttatt gtccatatac agacccttcc 58500  
tgtgtccctg gcagagcctg gccacagga caccccaact agcagaactg cccgaggagc 58560  
caaccaaatt aatctggtac aacctgcagt cgtctcctcc tgtgtgacc acatacttgt 58620  
catcggaaga gaagcggatg ttcgtcacat gagcagagt accaaagtaa cgtttgtgct 58680  
tggcctgtga ggaaaagcaa acgcagcggc tgagcacatg ttgaccccag taacttgttg 58740  
ggttattgat ccaccagctg cccacttcc agaagcccc actgctctgt gtgcagaagg 58800  
ccttgatgag aagggtgcct gccgtggcct tgcactttcc cttactctta aggctgtaga 58860  
cttctctccc ctgatgccca ggctcaagtc tcaacagtaa gcactgcact ttccaggtgc 58920  
atcaatcagc cacccttgct gatttcctg cctgatttct tcccaactt tgtggccatt 58980  
tgtccattca ccaggggcaa gccaaagccc catggggctg gatccatgat aactgaagg 59040  
catctatatg actgtatagg agcatggc ccgagacagct caggaggact cacgaatttt 59100  
tctgtgcatg gaaaatcaaa gagcttcagc agcccgaagt catcccctgt gacaatgttc 59160  
aagccagcat gggtcacaca tgcacagttg acatcagcct tgtctgcgtt tcgtggccag 59220  
attccaatga cttcatctcc gagaacactg ttccaagagg aaaaggtatt aggaagatgg 59280  
gacatagttt cctaggggtg ttgtcccctc ctaaggtaaa aagtagatag gaattgtagg 59340  
tcatttggtc acgtgggcac accctgctct gcattttcac caccaggcac agcccttccc 59400  
caactcccct acattccaga aagaaaactt ttattttatt ttttcttctt tatagttcca 59460  
ctgaatatgt atgttggcaa ggacagagtt cctgtacctt ttatcttttag gttactagaa 59520  
gcttcattgt tgctgggctt ggcaaacat ttgaacttgc tgaatgtggc ttgggggttg 59580  
tacgaatgat taaacaaaaa gaaagccctg atcgcataaa atcctcccct aagccagtgt 59640  
ctagcagctt tgcctcctcc cccactgaga aaagacagtt tcatctcagc tcttcctatc 59700

ctggccatca caaaccaga ggcagagctg gggcctcttc ctcaaccaga gttctcttca 59760  
 ttaccttgt ccaggaagcc caggtgatct tctcaacaac catggcttca gttacttgct 59820  
 tccccagggg aacttcatgt acttggcgct tataggctcc tgttgacacc tgcaagagga 59880  
 gaggaactga gtccatctgc ttcctcagtt ccacagactc tcttggctgt ctttcccaac 59940  
 actaactctg cccagttac gcttttcttt aaatccaaac tcagctcctg gctacaaagc 60000  
 caataaacag tccgttgccc cacagcccat gctaaaattc ataggtaggg tgtgttctac 60060  
 ctccccaacc cctgtcaaca cacaacagcc tatgttaaaa ttcagagtat cttctatcca 60120  
 tttctacccc caccacgagg gatggtgaac atgtcaagtg ccctcttgga gtctcctaaa 60180  
 ggaaactggc cactgttttc acattaaagg acacttgcca gtgtcttaca tcctaggtct 60240  
 cttctctccc catggggatg gtgtctctac ccatgtcacc agggttttcc ttgagttcat 60300  
 ggaaagatcc taaatctttc ccacctcagg ttttcaatgc agatggcttg ggacagaaat 60360  
 cctgccccct ttgttaactc cctcctacag ggcagacatt gctcagccta acgaatgctt 60420  
 ttttagaagg gaggcaggtc taagttgagt gcctcttcag atgctgcctg acaagctaca 60480  
 ctttgccttg actgtcagtc cttgccttct ccatggaagt gtgataagct ccagaagaaa 60540  
 tgaacatact atatctatcc aaaagcctgc ctagctgagg ctttgttgga tacatttgaa 60600  
 aaatgaatat aagtt 60615

<210> 10  
 <211> 1162  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 10

Met Glu Asp Ile Asp Gln Ser Ser Leu Val Ser Ser Ser Ala Asp Ser  
 1 5 10 15

Pro Pro Arg Pro Pro Pro Ala Phe Lys Tyr Gln Phe Val Thr Glu Pro  
 20 25 30

Glu Asp Glu Glu Asp Glu Glu Asp Glu Glu Glu Glu Glu Asp Asp Glu  
 35 40 45



Asp Leu Glu Glu Leu Glu Val Leu Glu Arg Lys Pro Ala Ala Gly Leu  
50 55 60

Ser Ala Ala Pro Val Pro Pro Ala Ala Ala Pro Leu Leu Asp Phe Ser  
65 70 75 80

Ser Asp Ser Val Pro Pro Ala Pro Arg Gly Pro Leu Pro Ala Ala Pro  
85 90 95

Pro Thr Ala Pro Glu Arg Gln Pro Ser Trp Glu Arg Ser Pro Ala Ala  
100 105 110

Ser Ala Pro Ser Leu Pro Pro Ala Ala Ala Val Leu Pro Ser Lys Leu  
115 120 125

Pro Glu Asp Asp Glu Pro Pro Ala Arg Pro Pro Ala Pro Ala Gly Ala  
130 135 140

Ser Pro Leu Ala Glu Pro Ala Ala Pro Pro Ser Thr Pro Ala Ala Pro  
145 150 155 160

Lys Arg Arg Gly Ser Gly Ser Val Asp Glu Thr Leu Phe Ala Leu Pro  
165 170 175

Ala Ala Ser Glu Pro Val Ile Pro Ser Ser Ala Glu Lys Ile Met Asp  
180 185 190

Leu Lys Glu Gln Pro Gly Asn Thr Val Ser Ser Gly Gln Glu Asp Phe  
195 200 205

Pro Ser Val Leu Phe Glu Thr Ala Ala Ser Leu Pro Ser Leu Ser Pro  
210 215 220

Leu Ser Thr Val Ser Phe Lys Glu His Gly Tyr Leu Gly Asn Leu Ser  
225 230 235 240



Ser Ala Thr Glu Ser Thr Ala Ala Asn Ile Phe Pro Val Leu Glu Asp  
450 455 460

His Thr Ser Glu Asn Lys Thr Asp Glu Lys Lys Ile Glu Glu Arg Lys  
465 470 475 480

Ala Gln Ile Ile Thr Glu Lys Thr Ser Pro Lys Thr Ser Asn Pro Phe  
485 490 495

Leu Val Ala Ile His Asp Ser Glu Ala Asp Tyr Val Thr Thr Asp Asn  
500 505 510

Leu Ser Lys Val Thr Glu Ala Val Val Ala Thr Met Pro Glu Gly Leu  
515 520 525

Thr Pro Asp Leu Val Gln Glu Ala Cys Glu Ser Glu Leu Asn Glu Ala  
530 535 540

Thr Gly Thr Lys Ile Ala Tyr Glu Thr Lys Val Asp Leu Val Gln Thr  
545 550 555 560

Ser Glu Ala Ile Gln Glu Ser Ile Tyr Pro Thr Ala Gln Leu Cys Pro  
565 570 575

Ser Phe Glu Glu Ala Glu Ala Thr Pro Ser Pro Val Leu Pro Asp Ile  
580 585 590

Val Met Glu Ala Pro Leu Asn Ser Leu Leu Pro Ser Thr Gly Ala Ser  
595 600 605

Val Ala Gln Pro Ser Ala Ser Pro Leu Glu Val Pro Ser Pro Val Ser  
610 615 620

Tyr Asp Gly Ile Lys Leu Glu Pro Glu Asn Pro Pro Pro Tyr Glu Glu  
625 630 635 640

Ala Met Ser Val Ala Leu Lys Thr Ser Asp Ser Lys Glu Glu Ile Lys  
645 650 655

Glu Pro Glu Ser Phe Asn Ala Ala Ala Gln Glu Ala Glu Ala Pro Tyr  
660 665 670

Ile Ser Ile Ala Cys Asp Leu Ile Lys Glu Thr Lys Leu Ser Thr Glu  
675 680 685

Pro Ser Pro Glu Phe Ser Asn Tyr Ser Glu Ile Ala Lys Phe Glu Lys  
690 695 700

Ser Val Pro Asp His Cys Glu Leu Val Asp Asp Ser Ser Pro Glu Ser  
705 710 715 720

Glu Pro Val Asp Leu Phe Ser Asp Asp Ser Ile Pro Glu Val Pro Gln  
725 730 735

Thr Gln Glu Glu Ala Val Met Leu Met Lys Glu Ser Leu Thr Glu Val  
740 745 750

Ser Glu Thr Val Thr Gln His Lys His Lys Glu Arg Leu Ser Ala Ser  
755 760 765

Pro Gln Glu Val Gly Lys Pro Tyr Leu Glu Ser Phe Gln Pro Asn Leu  
770 775 780

His Ile Thr Lys Asp Ala Ala Ser Asn Glu Ile Pro Thr Leu Thr Lys  
785 790 795 800

Lys Glu Thr Ile Ser Leu Gln Met Glu Glu Phe Asn Thr Ala Ile Tyr  
805 810 815

Ser Asn Asp Asp Leu Leu Ser Ser Lys Glu Asp Lys Met Lys Glu Ser  
820 825 830

Glu Thr Phe Ser Asp Ser Ser Pro Ile Glu Ile Ile Asp Glu Phe Pro  
835 840 845

Thr Phe Val Ser Ala Lys Asp Asp Ser Pro Lys Glu Tyr Thr Asp Leu  
850 855 860

Glu Val Ser Asn Lys Ser Glu Ile Ala Asn Val Gln Ser Gly Ala Asn  
865 870 875 880

Ser Leu Pro Cys Ser Glu Leu Pro Cys Asp Leu Ser Phe Lys Asn Thr  
885 890 895

Tyr Pro Lys Asp Glu Ala His Val Ser Asp Glu Phe Ser Lys Ser Arg  
900 905 910

Ser Ser Val Ser Lys Val Pro Leu Leu Leu Pro Asn Val Ser Ala Leu  
915 920 925

Glu Ser Gln Ile Glu Met Gly Asn Ile Val Lys Pro Lys Val Leu Thr  
930 935 940

Lys Glu Ala Glu Glu Lys Leu Pro Ser Asp Thr Glu Lys Glu Asp Arg  
945 950 955 960

Ser Leu Thr Ala Val Leu Ser Ala Glu Leu Asn Lys Thr Ser Val Val  
965 970 975

Asp Leu Leu Tyr Trp Arg Asp Ile Lys Lys Thr Gly Val Val Phe Gly  
980 985 990

Ala Ser Leu Phe Leu Leu Leu Ser Leu Thr Val Phe Ser Ile Val Ser  
995 1000 1005

Val Thr Ala Tyr Ile Ala Leu Ala Leu Leu Ser Val Thr Ile Ser  
1010 1015 1020

Phe Arg Ile Tyr Lys Gly Val Ile Gln Ala Ile Gln Lys Ser Asp  
1025 1030 1035

Glu Gly His Pro Phe Arg Ala Tyr Leu Glu Ser Glu Val Ala Ile  
 1040 1045 1050

Ser Glu Glu Leu Val Gln Lys Tyr Ser Asn Ser Ala Leu Gly His  
 1055 1060 1065

Val Asn Ser Thr Ile Lys Glu Leu Arg Arg Leu Phe Leu Val Asp  
 1070 1075 1080

Asp Leu Val Asp Ser Leu Lys Phe Ala Val Leu Met Trp Val Phe  
 1085 1090 1095

Thr Tyr Val Gly Ala Leu Phe Asn Gly Leu Thr Leu Leu Ile Leu  
 1100 1105 1110

Ala Leu Ile Ser Leu Phe Ser Ile Pro Val Ile Tyr Glu Arg His  
 1115 1120 1125

Gln Ala Gln Ile Asp His Tyr Leu Gly Leu Ala Asn Lys Ser Val  
 1130 1135 1140

Lys Asp Ala Met Ala Lys Ile Gln Ala Lys Ile Pro Gly Leu Lys  
 1145 1150 1155

Arg Lys Ala Glu  
 1160

<210> 11

<211> 582

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 11

atggctgcc a tccggaagaa actggtgatt gttggtgatg gagcctgtgg aaagacatgc 60

ttgctcatag tcttcagcaa ggaccagttc ccagaggtgt atgtgcccac agtgtttgag 120

aactatgtgg cagatatcga ggtggatgga aagcaggtag agttggcttt gtgggacaca 180

gctgggcagg aagattatga tcgcctgagg cccctctcct acccagatac cgatgttata 240

ctgatgtgtt tttccatcga cagccctgat agtttagaaa acatcccaga aaagtggacc 300  
 ccagaagtca agcatttctg tcccaacgtg cccatcatcc tggttgggaa taagaaggat 360  
 cttcggaatg atgagcacac aaggcgggag ctagccaaga tgaagcagga gccggtgaaa 420  
 cctgaagaag gcagagatat ggcaaacagg attggcgctt ttgggtacat ggagtgttca 480  
 gcaaagacca aagatggagt gagagagggtt ttgaaatgg ctacgagagc tgctctgcaa 540  
 gctagacgtg ggaagaaaaa atctggttgc cttgtcttgt ga 582

<210> 12  
 <211> 193  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 12

Met Ala Ala Ile Arg Lys Lys Leu Val Ile Val Gly Asp Gly Ala Cys  
 1 5 10 15

Gly Lys Thr Cys Leu Leu Ile Val Phe Ser Lys Asp Gln Phe Pro Glu  
 20 25 30

Val Tyr Val Pro Thr Val Phe Glu Asn Tyr Val Ala Asp Ile Glu Val  
 35 40 45

Asp Gly Lys Gln Val Glu Leu Ala Leu Trp Asp Thr Ala Gly Gln Glu  
 50 55 60

Asp Tyr Asp Arg Leu Arg Pro Leu Ser Tyr Pro Asp Thr Asp Val Ile  
 65 70 75 80

Leu Met Cys Phe Ser Ile Asp Ser Pro Asp Ser Leu Glu Asn Ile Pro  
 85 90 95

Glu Lys Trp Thr Pro Glu Val Lys His Phe Cys Pro Asn Val Pro Ile  
 100 105 110

Ile Leu Val Gly Asn Lys Lys Asp Leu Arg Asn Asp Glu His Thr Arg  
 115 120 125

Arg Glu Leu Ala Lys Met Lys Gln Glu Pro Val Lys Pro Glu Glu Gly  
 130 135 140

Arg Asp Met Ala Asn Arg Ile Gly Ala Phe Gly Tyr Met Glu Cys Ser  
 145 150 155 160

Ala Lys Thr Lys Asp Gly Val Arg Glu Val Phe Glu Met Ala Thr Arg  
 165 170 175

Ala Ala Leu Gln Ala Arg Arg Gly Lys Lys Lys Ser Gly Cys Leu Val  
 180 185 190

Leu

<210> 13

<211> 1145

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 13

atgtccaatc ctggtgatgt ccgacctgtt ccgcacagga gcaaagtgtg ccgttgtctc 60  
 ttcggtcccg tggacagtga gcagttgcgc cgtgattgcg atgcgctcat ggccgggctgt 120  
 ctccaggagg cccgagaacg gtggaacttt gacttcgtca cggagacgcc gctggagggc 180  
 aactttgtct gggagcgcgt tcggagccta gggctgcca aggtctacct gagccctggg 240  
 tcccgcagcc gtgacgacct gggagggggac aagaggccca gtacttcctc tgccctgctg 300  
 caggggccag ctccagagga ccacgtggcc ttgtcgctgt cttgcactct ggtgtctgag 360  
 cggcctgaag attccccggg tgggcccga acatctcagg gccgaaaacg gaggcagacc 420  
 agcctgacag gtaaggacag agaagagaag gagaaagatc ctgcaagagg cctggagagg 480  
 agaggccacc atttgaggat ggcctttaca gagaacattc cagcccttcc ccaccaccaa 540  
 gccattccat aggcgtggga cctcgtgggg ctcagaggaa cagttgatcc aggcattttt 600  
 ctctgcagtg accgaaatgc ccaggatagt gtggtgattg gcagtagagc tctaagaagg 660



gagccgggct gaagagatgg ctacgactt actcttgctg agggcctgag ttcgattccc 720  
 agcaccggaa atgacaactt cctataacta actctgggcg ttgggggatc taccctctct 780  
 agagccctgt ccctctgacc aggagggtgt gtgccctgtg gctgtggctt ttccccacga 840  
 tgagccacat gtcccttaga ctctggggaa tgatgtcctt ccccttggca tctggcctga 900  
 catctgttct ctctccacag atttctatca ctccaagcgc agattggtct tctgcaagag 960  
 aaaaccctga agtgcccacg ggagccccgc cctcttctgc tgtgggtcag gaggcctctt 1020  
 ccccatcttc ggccttagcc ctactctgt gtgtcttaat tattatttgt gttttaattt 1080  
 aaacgtctcc tgatatacgc tgcctgccct ctcccagtct ccaaacttaa agttatttaa 1140  
 aaaaaa 1145

<210> 14  
 <211> 159  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 14

Met Ser Asn Pro Gly Asp Val Arg Pro Val Pro His Arg Ser Lys Val  
 1 5 10 15

Cys Arg Cys Leu Phe Gly Pro Val Asp Ser Glu Gln Leu Arg Arg Asp  
 20 25 30

Cys Asp Ala Leu Met Ala Gly Cys Leu Gln Glu Ala Arg Glu Arg Trp  
 35 40 45

Asn Phe Asp Phe Val Thr Glu Thr Pro Leu Glu Gly Asn Phe Val Trp  
 50 55 60

Glu Arg Val Arg Ser Leu Gly Leu Pro Lys Val Tyr Leu Ser Pro Gly  
 65 70 75 80

Ser Arg Ser Arg Asp Asp Leu Gly Gly Asp Lys Arg Pro Ser Thr Ser  
 85 90 95

Ser Ala Leu Leu Gln Gly Pro Ala Pro Glu Asp His Val Ala Leu Ser  
 100 105 110

Leu Ser Cys Thr Leu Val Ser Glu Arg Pro Glu Asp Ser Pro Gly Gly  
 115 120 125

Pro Gly Thr Ser Gln Gly Arg Lys Arg Arg Gln Thr Ser Leu Thr Asp  
 130 135 140

Phe Tyr His Ser Lys Arg Arg Leu Val Phe Cys Lys Arg Lys Pro  
 145 150 155

<210> 15  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Artificial Sequence

<400> 15

Gly Gly Trp Lys Trp Trp Pro Gly Ile Phe  
 1 5 10

<210> 16  
 <211> 3259  
 <212> DNA  
 <213> Rattus norvegicus

<400> 16  
 cagctccggc gggcagcagg cgctggagcg catcgagtt cagctcagcg cagcaccatc 60  
 ggtctgcgga gcggactgag ctagaagcgg agcgctgacg ccggaggcgt gcaatgagga 120  
 gggcagggtgc tgcctgcagc gccatggacc ggctgcgcct gctgctgctg ctgattctag 180  
 ggggtgtcctc tggaggtgcc aaggagacat gttccacagg cctgtacacc cacagcggag 240  
 agtgctgcaa agcctgcaac ttgggcgaag gcgtggccca gccctgcgga gcccaaccaga 300  
 ccgtgtgtga accctgcctg gacaatgtta cattctccga tgtggtgagc gccactgagc 360  
 cgtgcaagcc gtgcaccgag tgcctgggcc tcgagagcat gtccgctccc tgtgtggagg 420

cagacgatgc agtgtgcaga tgtgcctatg gctactacca ggacgaggag actggccact 480  
gtgaggcttg cagcgtgtgc gaggtgggct cgggactcgt gttctcctgc caggacaaac 540  
agaacacagt gtgtgaagag tgcccagagg gcacatactc agacgaagcc aaccacgtgg 600  
accctgtcct accctgcacg gtgtgagagg aactgagcg ccagttacgc gagtgcacgc 660  
cctgggctga tgctgaatgc gaagagatcc ctggtcgatg gatcccaagg tctacgcccc 720  
cggagggtc cgacagcaca gcgcccagca cccaggagcc tgaggttcct ccagagcaag 780  
accttgtacc cagtacagtg gcggatatgg tgaccactgt gatgggcagc tcccagcctg 840  
tagtgacccg cggcaccacc gacaacctca ttcctgtcta ttgctccatc ttggctgctg 900  
tggtcgtggg ccttgtggcc tatattgctt tcaagagggtg gaacagctgc aaacaaaata 960  
aacaaggcgc caacagccgc cccgtgaacc agacgcccc accggaggga gagaaactgc 1020  
acagcgacag tggcatctct gtggacagcc agagcctgca cgaccagcag acccatacgc 1080  
agactgcctc aggccaggcc ctcaagggtg atggcaacct ctacagtagc ctgcccctga 1140  
ccaagcgtga ggaggtagag aaactgctca acggggatac ctggcgacat ctggcaggcg 1200  
agctgggtta ccagcctgaa catatagact cctttacca cgaggcctgc ccagtgcgag 1260  
ccctgctggc cagctggggt gccaggaca gtgcaacgct tgatgccctt ttagccgccc 1320  
tgcgacgcat ccagagagct gacattgtgg agagtctatg cagcgagtcc actgccacat 1380  
ccccagtgtg aactcacaga ctgggagccc ctgtcctgtc ccacattccg acgactgatg 1440  
ttctagccag ccccccacaga gctgccccct ctccctcggg gatggcccaa cggtcagaac 1500  
ggagcatctc tgtgcagggc ctctgtgttc cactcctga ctccgttgct gctcccagg 1560  
gggcccttgc ttctgaccac cctctctca gcaagagaga gagagaggac caccgagcc 1620  
tgacttgctc catttccatc tcaggccttt ccttcctttc tacacattag ctgtgtcaga 1680  
tctgggggtt tgacactagg agaaggagc gggggcaccc ctaagactca ggaggtactg 1740  
aagaaccaga gccatggact ccacactgtg aaccggagaa caaggggcgg ggcattgtgg 1800  
taggctagac cttccttagc ccctcccttc tcccctctgg ccaaagaaga ggattacgga 1860  
cctatctgag ctgaaagcag gtttgaacc cagcccacac ttctctctca cacacaggat 1920

ggtaaaaccc agagaaaggc agggactgac ctaggccacc caaccacagg aagaacaaat 1980  
 gaaggctgat acactccgtt tctgaatgag ggcgctcaagt gtgcttggtg acagggatgg 2040  
 cgtgactttc agggaaatat ctggaagcca tgtctgcccc gccctcaacc acttccaggc 2100  
 ccctacccaa cccttgtgca gatgaactgt ttgttcaagg gctggtccat tggctctattc 2160  
 tgatggagtc aagctaaggg ctcaggctta tccataaggc atttgtggag agatgaatct 2220  
 gttagtgcgc tcattcttgg cataagcctg aagccaacac ggcccttaat gtcagccctc 2280  
 ggggtcagga accaaggact cccacccac aatccaacac tatactacat tacacacaca 2340  
 cacacacaca cacacacaca cacacacaca cacacacaga tatcttgctt ttctccccat 2400  
 ggctcttttg gggctgagac tagatcctgc tgggagtcac tgccagttag agatccggag 2460  
 gggacagagc tgagcttcat ggggctgtct tcctcgcccc cgggtctggc aggccaagaa 2520  
 tgactgcac tgagctggtg tctgtcttcc aatggcctgt gcgtggagga aatgctccca 2580  
 ctctccctt tcttgaagct gccccagaa gactacagt caaaagagca gactggtgtg 2640  
 agaacacaag aaaaagcaga tgctggccct gcagctgtg gcagctttct cctcagcttc 2700  
 aaggccctg caaaggacgg atttcctgag cacggccagg aaggggcaag agggttcgg 2760  
 tcagtggcgc ttctccccg ctccttggcc tgttctgttt tgcttgctgt tggaatgagt 2820  
 gggcaccccc tctatttagc atgaaggagc cccaggcagg gtatgcacag actgaccacc 2880  
 atccctcccc acccagggtc cacccaaccc ggtgaagaga ccaggagcat tgtacgcata 2940  
 cgcgggtggg atttttatgg accccaatct gcaattccca gacacctggg aagtgggaca 3000  
 ttctttgtgt atttatttt cccccagga gctggggagt ggtggggggc tgcaggtacg 3060  
 gtttagcatg tgtttggttc tgggggtctc tccagccttg ttttgggcca agttggaacc 3120  
 tctggccctc cagctggtga ctatgaactc cagacccctt cgtgctcccc gacgccttcc 3180  
 ccttgcaccc tgtgtaacca ttctgttggg ccctcccaaa acctacacat aaaacataca 3240  
 ggaggaccat taaattggc 3259

&lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 425

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Rattus norvegicus

&lt;400&gt; 17

Met Arg Arg Ala Gly Ala Ala Cys Ser Ala Met Asp Arg Leu Arg Leu  
 1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Ile Leu Gly Val Ser Ser Gly Gly Ala Lys Glu Thr  
 20 25 30

Cys Ser Thr Gly Leu Tyr Thr His Ser Gly Glu Cys Cys Lys Ala Cys  
 35 40 45

Asn Leu Gly Glu Gly Val Ala Gln Pro Cys Gly Ala Asn Gln Thr Val  
 50 55 60

Cys Glu Pro Cys Leu Asp Asn Val Thr Phe Ser Asp Val Val Ser Ala  
 65 70 75 80

Thr Glu Pro Cys Lys Pro Cys Thr Glu Cys Leu Gly Leu Gln Ser Met  
 85 90 95

Ser Ala Pro Cys Val Glu Ala Asp Asp Ala Val Cys Arg Cys Ala Tyr  
 100 105 110

Gly Tyr Tyr Gln Asp Glu Glu Thr Gly His Cys Glu Ala Cys Ser Val  
 115 120 125

Cys Glu Val Gly Ser Gly Leu Val Phe Ser Cys Gln Asp Lys Gln Asn  
 130 135 140

Thr Val Cys Glu Glu Cys Pro Glu Gly Thr Tyr Ser Asp Glu Ala Asn  
 145 150 155 160

His Val Asp Pro Cys Leu Pro Cys Thr Val Cys Glu Asp Thr Glu Arg  
 165 170 175

Gln Leu Arg Glu Cys Thr Pro Trp Ala Asp Ala Glu Cys Glu Glu Ile  
 180 185 190

Pro Gly Arg Trp Ile Pro Arg Ser Thr Pro Pro Glu Gly Ser Asp Ser  
195 200 205

Thr Ala Pro Ser Thr Gln Glu Pro Glu Val Pro Pro Glu Gln Asp Leu  
210 215 220

Val Pro Ser Thr Val Ala Asp Met Val Thr Thr Val Met Gly Ser Ser  
225 230 235 240

Gln Pro Val Val Thr Arg Gly Thr Thr Asp Asn Leu Ile Pro Val Tyr  
245 250 255

Cys Ser Ile Leu Ala Ala Val Val Val Gly Leu Val Ala Tyr Ile Ala  
260 265 270

Phe Lys Arg Trp Asn Ser Cys Lys Gln Asn Lys Gln Gly Ala Asn Ser  
275 280 285

Arg Pro Val Asn Gln Thr Pro Pro Pro Glu Gly Glu Lys Leu His Ser  
290 295 300

Asp Ser Gly Ile Ser Val Asp Ser Gln Ser Leu His Asp Gln Gln Thr  
305 310 315 320

His Thr Gln Thr Ala Ser Gly Gln Ala Leu Lys Gly Asp Gly Asn Leu  
325 330 335

Tyr Ser Ser Leu Pro Leu Thr Lys Arg Glu Glu Val Glu Lys Leu Leu  
340 345 350

Asn Gly Asp Thr Trp Arg His Leu Ala Gly Glu Leu Gly Tyr Gln Pro  
355 360 365

Glu His Ile Asp Ser Phe Thr His Glu Ala Cys Pro Val Arg Ala Leu  
370 375 380

Leu Ala Ser Trp Gly Ala Gln Asp Ser Ala Thr Leu Asp Ala Leu Leu  
 385 390 395 400

Ala Ala Leu Arg Arg Ile Gln Arg Ala Asp Ile Val Glu Ser Leu Cys  
 405 410 415

Ser Glu Ser Thr Ala Thr Ser Pro Val  
 420 425

<210> 18

<211> 4167

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 18

```

atgagccggc ccccgccgac ggggaaaatg cccggcgccc ccgagaccgc gccggggggac      60
ggggcaggcg cgagccgcca gaggaagctg gaggcgctga tccgagaccc tcgctccccc      120
atcaacgtgg agagcttgct ggatggctta aattccttgg tccttgattt agattttcct      180
gctttgagga aaaacaagaa catagataat ttcttaaata gatatgagaa aattgtgaaa      240
aaaatcaaag gtctacagat gaaggcagaa gactatgatg ttgtaaaagt tattggaaga      300
ggtgcttttg gtgaagtgca gttggttcgt cacaaggcat cgcagaaggt ttatgctatg      360
aagcttctta gtaagtttga aatgataaaa agatcagatt ctgccttttt ttgggaagaa      420
agagatatta tggcctttgc caatagcccc tgggtgggtc agctttttta tgcctttcaa      480
gatgataggt atctgtacat ggtaatggag tacatgcctg gtggagacct tgtaaacctt      540
atgagtaatt atgatgtgcc tgaaaaatgg gccaaatttt aactgtctga agttgttctt      600
gctctggatg caatacactc catgggttta atacacagag atgtgaagcc tgacaacatg      660
ctcttggata aacatggaca tctaaaatta gcagattttg gcacgtgtat gaagatggat      720
gaaacaggca tgggtacattg tgatacagca gttggaacac cggattatat atcacctgag      780
gttctgaaat cacaaggggg tgatggtttc tatgggcgag aatgtgattg gtgggtctgta      840
ggtgttttcc tttatgagat gctagtgggg gatactccat tttatgcgga ttcacttgta      900
ggaacatata gcaaaattat ggatcataag aattcactgt gtttcctga agatgcagaa      960

```

atttccaaac atgcaaagaa tctcatctgt gctttcttaa cagataggga ggtacgactt 1020  
gggagaaatg ggggtggaaga aatcagacag catcctttct ttaagaatga tcagtggcat 1080  
tgggataaca taagagaaac ggcagctcct gtagtacctg aactcagcag tgacatagac 1140  
agcagcaatt tcgatgacat tgaagatgac aaaggagatg tagaaacctt cccaattcct 1200  
aaagcttttg ttggaaatca gctgcctttc atcggattta cctactatag agaaaattta 1260  
ttattaagtg actctccatc ttgtagagaa aatgattcca tacaatcaag gaaaaatgaa 1320  
gaaagtcaag agattcagaa aaaactgtat acattagaag aacatcttag caatgagatg 1380  
caagccaaag aggaactgga acagaagtgc aaatctgtta atactcgcct agaaaaaaca 1440  
gcaaaggagc tagaagagga gattacctta cggaaaagtg tggaatcagc attaagacag 1500  
ttagaaagag aaaaggcgct tcttcagcac aaaaatgcag aatatcagag gaaagctgat 1560  
catgaagcag acaaaaaacg aaatttggaa aatgatgtta acagcttaaa agatcaactt 1620  
gaagatttga aaaaaagaaa tcaaaactct caaatatcca ctgagaaagt gaatcaactc 1680  
cagagacaac tggatgaaac caatgcttta ctgcgaacag agtctgatac tgcagcccgg 1740  
ttaaggaaaa ccaggcaga aagttcaaaa cagattcagc agctggaatc taacaataga 1800  
gatctacaag ataaaaactg cctgctggag actgccaagt taaaacttga aaaggaattt 1860  
atcaatcttc agtcagctct agaatctgaa aggagggatc gaacccatgg atcagagata 1920  
attaatgatt tacaaggtag aatatgtggc ctagaagaag atttaaagaa cggcaaaatc 1980  
ttactagcga aagtagaact ggagaagaga caacttcagg agagatttac tgatttggaa 2040  
aaggaaaaaa gcaacatgga aatagatatg acataccaac taaaagttat acagcagagc 2100  
ctagaacaag aagaagctga acataaggcc acaaaggcac gactagcaga taaaaataag 2160  
atctatgagt ccatcgaaga agccaaatca gaagccatga aagaaatgga gaagaagctc 2220  
ttggaggaaa gaacttttaa acagaaagtg gagaacctat tgctagaagc tgagaaaaga 2280  
tgttctctat tagactgtga cctcaaacag tcacagcaga aaataaatga gctccttaaa 2340  
cagaaagatg tgctaaatga ggatgttaga aacctgacat taaaaataga gcaagaaact 2400  
cagaagcgct gccttacaca aaatgacctg aagatgcaaa cacaacaggt taacacacta 2460



aaaatgtcag aaaagcagtt aaagcaagaa aataaccatc tcatggaaat gaaaatgaac 2520  
ttggaaaaac aaaatgctga acttcgaaaa gaacgtcagg atgcagatgg gcaaatgaaa 2580  
gagctccagg atcagctcga agcagaacag tatttctcaa ccctttataa aacacaagtt 2640  
agggagctta aagaagaatg tgaagaaaag accaaacttg gtaaagaatt gcagcagaag 2700  
aaacaggaat tacaggatga acgggactct ttggctgccc aactggagat caccttgacc 2760  
aaagcagatt ctgagcaact ggctcggttca attgctgaag aacaatattc tgattttgaa 2820  
aaagagaaga tcatgaaaga gctggagatc aaagagatga tggctagaca caaacaggaa 2880  
cttacgaaa aagatgctac aattgcttct cttgaggaaa ctaataggac actaactagt 2940  
gatgttgcca atcttgcaaa tgagaaagaa gaattaaata acaaattgaa agatgttcaa 3000  
gagcaactgt caagattgaa agatgaagaa ataagcgcag cagctattaa agcacagttt 3060  
gagaagcagc tattaacaga aagaacactc aaaactcaag ctgtgaataa gttggctgag 3120  
atcatgaatc gaaaagaacc tgtcaagcgt ggtaatgaca cagatgtgcg gagaaaagag 3180  
aaggagaata gaaagctaca tatggagctt aaatctgaac gtgagaaatt gaccagcag 3240  
atgatcaagt atcagaaaga actgaatgaa atgcaggcac aaatagctga agagagccag 3300  
attcgaattg aactgcagat gacattggac agtaaagaca gtgacattga gcagctgcgg 3360  
tcacaactcc aagccttgca tattgggtctg gatagttcca gtataggcag tggaccaggg 3420  
gatgctgagg cagatgatgg gtttcagaa tcaagattag aaggatggct ttcattgcct 3480  
gtacgaaaca acactaagaa atttggatgg gttaaaaagt atgtgattgt aagcagtaag 3540  
aagattcttt tctatgacag tgaacaagat aaagaacaat ccaatcctta catggtttta 3600  
gatatagaca agttatttca tgtccgacca gttacacaga cagatgtgta tagagcagat 3660  
gctaaagaaa ttccaaggat attccagatt ctgtatgcca atgaaggaga aagtaagaag 3720  
gaacaagaat ttccagtga gccagttgga gaaaaatcta attatatattg ccacaaggga 3780  
catgagttaa ttctactct ttatcatttc ccaaccaact gtgaggcttg tatgaagccc 3840  
ctgtggcaca tgtttaagcc tcctcctgct ttggagtgcc gccgttgcca tattaagtgt 3900  
cataaagatc atatggacaa aaaggaggag attatagcac cttgcaaagt atattatgat 3960

atttcaacgg caaagaatct gttattacta gcaaattcta cagaagagca gcagaagtgg 4020  
 gttagtcggt tgggtgaaaaa gatacctaaa aagccccccag ctccagaccc ttttgcccga 4080  
 tcattctccta gaacttcaat gaagatacag caaaaccagt ctattagacg gccaaagtcga 4140  
 cagcttgccc caaacaacc tagctaa 4167

<210> 19  
 <211> 1388  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 19

Met Ser Arg Pro Pro Pro Thr Gly Lys Met Pro Gly Ala Pro Glu Thr  
 1 5 10 15

Ala Pro Gly Asp Gly Ala Gly Ala Ser Arg Gln Arg Lys Leu Glu Ala  
 20 25 30

Leu Ile Arg Asp Pro Arg Ser Pro Ile Asn Val Glu Ser Leu Leu Asp  
 35 40 45

Gly Leu Asn Ser Leu Val Leu Asp Leu Asp Phe Pro Ala Leu Arg Lys  
 50 55 60

Asn Lys Asn Ile Asp Asn Phe Leu Asn Arg Tyr Glu Lys Ile Val Lys  
 65 70 75 80

Lys Ile Lys Gly Leu Gln Met Lys Ala Glu Asp Tyr Asp Val Val Lys  
 85 90 95

Val Ile Gly Arg Gly Ala Phe Gly Glu Val Gln Leu Val Arg His Lys  
 100 105 110

Ala Ser Gln Lys Val Tyr Ala Met Lys Leu Leu Ser Lys Phe Glu Met  
 115 120 125

Ile Lys Arg Ser Asp Ser Ala Phe Phe Trp Glu Glu Arg Asp Ile Met  
 130 135 140

Ala Phe Ala Asn Ser Pro Trp Val Val Gln Leu Phe Tyr Ala Phe Gln  
145 150 155 160

Asp Asp Arg Tyr Leu Tyr Met Val Met Glu Tyr Met Pro Gly Gly Asp  
165 170 175

Leu Val Asn Leu Met Ser Asn Tyr Asp Val Pro Glu Lys Trp Ala Lys  
180 185 190

Phe Tyr Thr Ala Glu Val Val Leu Ala Leu Asp Ala Ile His Ser Met  
195 200 205

Gly Leu Ile His Arg Asp Val Lys Pro Asp Asn Met Leu Leu Asp Lys  
210 215 220

His Gly His Leu Lys Leu Ala Asp Phe Gly Thr Cys Met Lys Met Asp  
225 230 235 240

Glu Thr Gly Met Val His Cys Asp Thr Ala Val Gly Thr Pro Asp Tyr  
245 250 255

Ile Ser Pro Glu Val Leu Lys Ser Gln Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Gly  
260 265 270

Arg Glu Cys Asp Trp Trp Ser Val Gly Val Phe Leu Tyr Glu Met Leu  
275 280 285

Val Gly Asp Thr Pro Phe Tyr Ala Asp Ser Leu Val Gly Thr Tyr Ser  
290 295 300

Lys Ile Met Asp His Lys Asn Ser Leu Cys Phe Pro Glu Asp Ala Glu  
305 310 315 320

Ile Ser Lys His Ala Lys Asn Leu Ile Cys Ala Phe Leu Thr Asp Arg  
325 330 335

Glu Val Arg Leu Gly Arg Asn Gly Val Glu Glu Ile Arg Gln His Pro  
 340 345 350

Phe Phe Lys Asn Asp Gln Trp His Trp Asp Asn Ile Arg Glu Thr Ala  
 355 360 365

Ala Pro Val Val Pro Glu Leu Ser Ser Asp Ile Asp Ser Ser Asn Phe  
 370 375 380

Asp Asp Ile Glu Asp Asp Lys Gly Asp Val Glu Thr Phe Pro Ile Pro  
 385 390 395 400

Lys Ala Phe Val Gly Asn Gln Leu Pro Phe Ile Gly Phe Thr Tyr Tyr  
 405 410 415

Arg Glu Asn Leu Leu Leu Ser Asp Ser Pro Ser Cys Arg Glu Asn Asp  
 420 425 430

Ser Ile Gln Ser Arg Lys Asn Glu Glu Ser Gln Glu Ile Gln Lys Lys  
 435 440 445

Leu Tyr Thr Leu Glu Glu His Leu Ser Asn Glu Met Gln Ala Lys Glu  
 450 455 460

Glu Leu Glu Gln Lys Cys Lys Ser Val Asn Thr Arg Leu Glu Lys Thr  
 465 470 475 480

Ala Lys Glu Leu Glu Glu Glu Ile Thr Leu Arg Lys Ser Val Glu Ser  
 485 490 495

Ala Leu Arg Gln Leu Glu Arg Glu Lys Ala Leu Leu Gln His Lys Asn  
 500 505 510

Ala Glu Tyr Gln Arg Lys Ala Asp His Glu Ala Asp Lys Lys Arg Asn  
 515 520 525

Leu Glu Asn Asp Val Asn Ser Leu Lys Asp Gln Leu Glu Asp Leu Lys  
 530 535 540

Lys Arg Asn Gln Asn Ser Gln Ile Ser Thr Glu Lys Val Asn Gln Leu  
545 550 555 560

Gln Arg Gln Leu Asp Glu Thr Asn Ala Leu Arg Thr Glu Ser Asp  
565 570 575

Thr Ala Ala Arg Leu Arg Lys Thr Gln Ala Glu Ser Ser Lys Gln Ile  
580 585 590

Gln Gln Leu Glu Ser Asn Asn Arg Asp Leu Gln Asp Lys Asn Cys Leu  
595 600 605

Leu Glu Thr Ala Lys Leu Lys Leu Glu Lys Glu Phe Ile Asn Leu Gln  
610 615 620

Ser Ala Leu Glu Ser Glu Arg Arg Asp Arg Thr His Gly Ser Glu Ile  
625 630 635 640

Ile Asn Asp Leu Gln Gly Arg Ile Cys Gly Leu Glu Glu Asp Leu Lys  
645 650 655

Asn Gly Lys Ile Leu Leu Ala Lys Val Glu Leu Glu Lys Arg Gln Leu  
660 665 670

Gln Glu Arg Phe Thr Asp Leu Glu Lys Glu Lys Ser Asn Met Glu Ile  
675 680 685

Asp Met Thr Tyr Gln Leu Lys Val Ile Gln Gln Ser Leu Glu Gln Glu  
690 695 700

Glu Ala Glu His Lys Ala Thr Lys Ala Arg Leu Ala Asp Lys Asn Lys  
705 710 715 720

Ile Tyr Glu Ser Ile Glu Glu Ala Lys Ser Glu Ala Met Lys Glu Met  
725 730 735

Glu Lys Lys Leu Leu Glu Glu Arg Thr Leu Lys Gln Lys Val Glu Asn  
 740 745 750

Leu Leu Leu Glu Ala Glu Lys Arg Cys Ser Leu Leu Asp Cys Asp Leu  
 755 760 765

Lys Gln Ser Gln Gln Lys Ile Asn Glu Leu Leu Lys Gln Lys Asp Val  
 770 775 780

Leu Asn Glu Asp Val Arg Asn Leu Thr Leu Lys Ile Glu Gln Glu Thr  
 785 790 795 800

Gln Lys Arg Cys Leu Thr Gln Asn Asp Leu Lys Met Gln Thr Gln Gln  
 805 810 815

Val Asn Thr Leu Lys Met Ser Glu Lys Gln Leu Lys Gln Glu Asn Asn  
 820 825 830

His Leu Met Glu Met Lys Met Asn Leu Glu Lys Gln Asn Ala Glu Leu  
 835 840 845

Arg Lys Glu Arg Gln Asp Ala Asp Gly Gln Met Lys Glu Leu Gln Asp  
 850 855 860

Gln Leu Glu Ala Glu Gln Tyr Phe Ser Thr Leu Tyr Lys Thr Gln Val  
 865 870 875 880

Arg Glu Leu Lys Glu Glu Cys Glu Glu Lys Thr Lys Leu Gly Lys Glu  
 885 890 895

Leu Gln Gln Lys Lys Gln Glu Leu Gln Asp Glu Arg Asp Ser Leu Ala  
 900 905 910

Ala Gln Leu Glu Ile Thr Leu Thr Lys Ala Asp Ser Glu Gln Leu Ala  
 915 920 925

Arg Ser Ile Ala Glu Glu Gln Tyr Ser Asp Leu Glu Lys Glu Lys Ile  
 930 935 940

Met Lys Glu Leu Glu Ile Lys Glu Met Met Ala Arg His Lys Gln Glu  
945 950 955 960

Leu Thr Glu Lys Asp Ala Thr Ile Ala Ser Leu Glu Glu Thr Asn Arg  
965 970 975

Thr Leu Thr Ser Asp Val Ala Asn Leu Ala Asn Glu Lys Glu Glu Leu  
980 985 990

Asn Asn Lys Leu Lys Asp Val Gln Glu Gln Leu Ser Arg Leu Lys Asp  
995 1000 1005

Glu Glu Ile Ser Ala Ala Ala Ile Lys Ala Gln Phe Glu Lys Gln  
1010 1015 1020

Leu Leu Thr Glu Arg Thr Leu Lys Thr Gln Ala Val Asn Lys Leu  
1025 1030 1035

Ala Glu Ile Met Asn Arg Lys Glu Pro Val Lys Arg Gly Asn Asp  
1040 1045 1050

Thr Asp Val Arg Arg Lys Glu Lys Glu Asn Arg Lys Leu His Met  
1055 1060 1065

Glu Leu Lys Ser Glu Arg Glu Lys Leu Thr Gln Gln Met Ile Lys  
1070 1075 1080

Tyr Gln Lys Glu Leu Asn Glu Met Gln Ala Gln Ile Ala Glu Glu  
1085 1090 1095

Ser Gln Ile Arg Ile Glu Leu Gln Met Thr Leu Asp Ser Lys Asp  
1100 1105 1110

Ser Asp Ile Glu Gln Leu Arg Ser Gln Leu Gln Ala Leu His Ile  
1115 1120 1125

Gly Leu Asp Ser Ser Ser Ile Gly Ser Gly Pro Gly Asp Ala Glu  
1130 1135 1140

Ala Asp Asp Gly Phe Pro Glu Ser Arg Leu Glu Gly Trp Leu Ser  
1145 1150 1155

Leu Pro Val Arg Asn Asn Thr Lys Lys Phe Gly Trp Val Lys Lys  
1160 1165 1170

Tyr Val Ile Val Ser Ser Lys Lys Ile Leu Phe Tyr Asp Ser Glu  
1175 1180 1185

Gln Asp Lys Glu Gln Ser Asn Pro Tyr Met Val Leu Asp Ile Asp  
1190 1195 1200

Lys Leu Phe His Val Arg Pro Val Thr Gln Thr Asp Val Tyr Arg  
1205 1210 1215

Ala Asp Ala Lys Glu Ile Pro Arg Ile Phe Gln Ile Leu Tyr Ala  
1220 1225 1230

Asn Glu Gly Glu Ser Lys Lys Glu Gln Glu Phe Pro Val Glu Pro  
1235 1240 1245

Val Gly Glu Lys Ser Asn Tyr Ile Cys His Lys Gly His Glu Phe  
1250 1255 1260

Ile Pro Thr Leu Tyr His Phe Pro Thr Asn Cys Glu Ala Cys Met  
1265 1270 1275

Lys Pro Leu Trp His Met Phe Lys Pro Pro Pro Ala Leu Glu Cys  
1280 1285 1290

Arg Arg Cys His Ile Lys Cys His Lys Asp His Met Asp Lys Lys  
1295 1300 1305

Glu Glu Ile Ile Ala Pro Cys Lys Val Tyr Tyr Asp Ile Ser Thr  
1310 1315 1320



Ala Lys Asn Leu Leu Leu Leu Ala Asn Ser Thr Glu Glu Gln Gln  
1325 1330 1335

Lys Trp Val Ser Arg Leu Val Lys Lys Ile Pro Lys Lys Pro Pro  
1340 1345 1350

Ala Pro Asp Pro Phe Ala Arg Ser Ser Pro Arg Thr Ser Met Lys  
1355 1360 1365

Ile Gln Gln Asn Gln Ser Ile Arg Arg Pro Ser Arg Gln Leu Ala  
1370 1375 1380

Pro Asn Lys Pro Ser  
1385

<210> 20  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Human adenovirus type 1

<400> 20

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg  
1 5 10

<210> 21  
<211> 6439  
<212> DNA  
<213> Human adenovirus type 1

<400> 21

aaatattttt gactagcgga ggctagaagg agagagatgg gtgcgagagc gtcagtatta 60  
agcggggggag aattagataa atgggaaaaa attcggttaa ggccaggggg aaagaaaaca 120  
tataaattaa aacatatagt atgggcaagc agggagctag aacgcttcgc agttaaccct 180  
ggcctgttag aaacatcagg aggctgtaga caaatattga aacagctaca tccatctctt 240  
cagacaggat cagaagaact taaatcatta tataatacag tagcaaccct ctattgtgtg 300  
catcaaagga tagagataag agacaccaag gaagcttttag acaagataga ggaagagcaa 360

aataaatgta agaaaaggga acagcaagca gcagctgaca caggaaacag cagccaggtc 420  
agccaaaatt accctatagt gcagaacctc caggggcaaa tggtagatca gtccatatca 480  
cctaggactt taaatgcatg ggtaaaagta gtagaagaga aggcttttag cccagaagta 540  
atacccatgt tttcagcatt atcagaagga gccacccac aagatttaaa caccatgcta 600  
aacacagtgg gaggacatca agcagctatg caaatgttaa aagaaaccat caatgaggaa 660  
gctgcagaat gggatagaat gcacccagtg catgcagggc ctgttgacc aggccagatg 720  
agagaaccaa ggggaagtga tatagcarga actactagta cccttcagga acaaatacaa 780  
tggatgacaa gtaatccacc tgtcccagta ggagaaatct ataaaagatg gataatcctg 840  
ggattaaata aaatagtaag aatgtatagt cctaccagca ttctggacat aaaacaagga 900  
ccaaaggaac cctttagaga ctatgtagac cggttctata aaactctaag agccgagcaa 960  
gcttcacagg aagtaaaagg ttggatgaca gaaacctgtg tggtcacaaa tgccaacca 1020  
gattgtaaga ctatttttaa agcattagga ccaggagcta cactagaaga aatgatgaca 1080  
gcatgtcagg gagtgggggg acccgccac aaagcaagag ttttggctga agcaatgagc 1140  
caagtaacaa attcagccac cataatgatg cagagaggca attttagaaa tcaaagaaaa 1200  
actgttaagt gtttcaactg tggcaaagaa gggcatatag ccagaaattg cagggccct 1260  
aggaaaaagg gctgttgga atgtggacag gaaggacacc aatgaaaga ttgtactgaa 1320  
agacaggcta attttttagg gaaaatctgg cttcccaca aggggaggcc gggaaacttt 1380  
cttcagagca gaccagagcc aacagccca ccagaggaga gtgtcaggtt tggggaagag 1440  
acagcaactc cctctcagaa gcaggggacg atagacaagg aactgtatcc tttagcttcc 1500  
ctcagatcac tctttggcaa cgaccctcg tcacaataaa gatagggggg caactaaagg 1560  
aagccctatt agatacagga gcagatgata cagtattaga agaatgaat ttgccaggaa 1620  
gatggaaacc aaaaatgata gggggaattg gaggctttat caaagtaaga cagtatgatc 1680  
agatacccct agaaatttgt ggacataaag ctataggtac agtattagta ggacctacac 1740  
ctgtcaacat aattggaaga aatctgttga ctcagattgg atgcacttta aattttcca 1800  
ttagtcctat tgaaactgta ccagtaaaat taaagccagg aatggatggc caaaagtta 1860

aacaatggcc attgacagaa gaaaaaataa aagcattaac agaaatttgt gcagacatgg 1920  
aaaaagaagg gaaaatttca aaaattgggc ctgaaaatcc atacaatact ccagtatttg 1980  
ccataaagaa aaaagacagt actaaatgga gaaaattagt agatttcaga gaacttaata 2040  
agagaactca agacttctgg gaagttcaat taggaatacc acatcccgca gggttaaaaa 2100  
agaaaaaatc agtaacagta ctagatatag gtgatgcata tttttcagta cccttagaca 2160  
gagaattcag gaagtatact gcatttacca tacctagtat aaacaatgag acaccaggga 2220  
ttagatatca gtacaatgtg cttccacagg ggtggaaagg atcaccagca atatttcaaa 2280  
gtagcatgat aaaaatctta gagcctttta ggaagcaaaa tccagaatta gttatctatc 2340  
aatacatgga tgatttgtat gtaggatcag acttagaaat agggcaacat agaacaaaaa 2400  
tagaagaact aagacaacat ctgttgaggt ggggattaac cacaccagac aaaaagcatc 2460  
agaaagaacc cccattcctt tggatgggct atgagctcca tcctgataaa tggacagtac 2520  
agcctataat gctgccagag aaggatagct ggactgtcaa tgacatacag aagttagtgg 2580  
gaaaattgaa ttgggcaagc cagatttatg cagggattaa agtaaggcaa ttatgtaaac 2640  
tccttagggg aaccaaagca ctaacagaag tagtgcctct aacagaagaa gcagagctag 2700  
agctggcaga aaacagggag attctaaaag aaccagtaca tggagtgtat tatgacccat 2760  
caaaagattt aatagcagaa atacaaaagc agggacaagg ccaatgggtca tatcaaattt 2820  
atcaagaacc atttaaaaat ctgaaaacag gaaagtatgc aagaacgagg ggtgcccaca 2880  
ctaatgatgt aagacaatta acagaggcag tgcaaaaaat aaccacagaa agcatagtaa 2940  
tatggggaaa gactcctaaa tttaaactgc ctatacaaaa ggaaacatgg gaaacatggt 3000  
ggacagagta ttggcaagcc acctggattc ctgagtggga gtttgtcaat acccctccct 3060  
tagtgaaatt atggtaccag ttagagaaag aaccattat aggagcagaa actttctatg 3120  
tagatggagc tgctaatagg gagactaaat taggaaaagc aggatatgtt actgacagag 3180  
gaagacaaaa agttgtctcc ctaactgaca caacaaatca gaagactgag ttacaagcaa 3240  
ttcatctagc tctgcaggat tcgggattag aggtaaacat agtaacagac tcacaatatg 3300  
cattaggaat cattcaagca caaccagata aaagtgaatc agaggtagtt aatcaaataa 3360

tagagcagtt aatcaacaag gaaaaagtct acctggcatg ggtaccagca cacaaaggaa 3420  
ttggaggaaa tgaacaagta gataaattag tcagtgtctg aatcaggaaa gtactatitt 3480  
tagatggaat agataaggcc caggaagaac atgagaagta tcacagtaat tggagaacaa 3540  
tggctagtga ttttaacctg ccacctgtgg tagctaaaga aatagtagcc agctgtgata 3600  
aatgtcagct aaaaggagaa gccatacatg gacaagtaga ctgtagtcca ggaatatggc 3660  
aactagattg tacacattta gaaggaaaag ttatcctggt agcagtccat gtagccagtg 3720  
ggtacataga agcagaagtt attccagcag agacagggca ggaaacagca tactttatct 3780  
taaaattagc aggaagatgg ccagtaaaaa caatacatag agacaatggc agcaatttca 3840  
ccagcgctac ggttaaagcc gcctgttggg gggcagggat caagcaggaa tttggcattc 3900  
cctacaatcc ccaaagtcaa ggagtagtag aatctatgaa taaagaatta aagaaaataa 3960  
taggacagat aagagatcag gctgagcatc ttaagacagc agtacaatg gcagtatttg 4020  
tccacaattt taaaagaaaa ggggggattg gggactacag tgcaggggaa agaataatag 4080  
acataatagc aacagacata caaaccaaag aactacaaaa acaaattaca aaaattcaaa 4140  
attttcgggt ttattacagg gacagcagag atccactttg gaaaggacca gcaaagctcc 4200  
tctggaaagg tgaaggggca gtagtaatac aagataatag tgatataaaa gtagtgccaa 4260  
gaaggaaagc aaagatcatt agggattatg gaaaacagat ggcaggtaat gattgtgtgg 4320  
caagtagaca ggatgaggat tagcacatgg aaaagttag taaaacacca tatgtatatt 4380  
tcaaagaaag ctaagggatg gttttataga catcactatg aaagcactca tccaaaaata 4440  
agttcagaag tacacatccc actaggggat gatagattgg taataacaac atattggggg 4500  
ctgcatacag gagaaagaga ctggcatttg ggtcaaggag tctccataga atggaggaaa 4560  
aggagatata gaacacaagt agaccctgaa ctagcagacc aactaattca tctgtactac 4620  
tttgactgtt tttcagaatc tgctataaga aatgccatat taggacgtat agttagtcct 4680  
aggtgtgaat atcaagcagg acataataag gtaggatctc tacaatactt ggcactagca 4740  
gcattaataa aaccaagaag gacaaagcca cctttgccta gtgttacgaa actgacagag 4800  
gatagatgga acaagcccca gaaaaccaag ggccgcagag ggagccatac aatgaatgga 4860

cactagagct tttagaagag cttaagaatg aagctgttag acattttcct tggacatggc 4920  
ttcatggcctt aggacaatat atctatgaaa cttatgggga tacttgggca ggagtggag 4980  
ccataataag aattctgcaa caactgctgt ttattcattt cagaattggg tgtcgacata 5040  
gcagaatagg cattaacatt caacggagga gagcaagaaa tggagccagt agatcctaaa 5100  
ttagagccct ggaagcatcc aggaagtcag cctaaaactg cttgtaacaa ttgctattgt 5160  
aaagtgtgtt gctttcattg ccaagtttgt ttacaaaaa aaggcttagg catctcctat 5220  
ggcaggaaga agcggagaca gcgacgaaga gtcctcagg acagtcagac tcatcaagct 5280  
cctctaccaa agcagtaagt agtaaagtga atgcaatctc tagcaatatt agcaatagta 5340  
gctttagtag tagcagcaat actagcaata gttgtgtgga ccatagtatt catagaatat 5400  
aggaaaatag taaggcaaag aaaaatagac aggttactta atagaatagc agaaagagca 5460  
gaagacagtg gcaatgaaag tgaaggagat caggaggaat tatcagcact tgttggtggag 5520  
agggggcacc ttgctccttg ggatattgat gatctgtagt gctgaggagt tgtgggtcac 5580  
agtctattat ggggtgcctg tgtggaaaga agcaaccacc actctatitt gtgcctcaga 5640  
tgctaaagct tatgatacag aggtgcataa tgtttgggct acacatgcct gtgtaccac 5700  
agacccaac ccacaagaag tattattggg aatgtgaca gaaaatttta acatgtggaa 5760  
aaataacatg gtagaacaaa tgcattgagga tatcatcagt ctatgggatc aaagttttaa 5820  
accatgtgta aaattaactc cactctgtgt tactttaaat tgcactgacg ttgatgggaa 5880  
gaatgctact aataccaata gtagtattaa aggagaaata aaaaactgct ctttcgatat 5940  
caccacaaac ataagagata aggtggagag acaatatgca tgtttttcta gtcttgatgt 6000  
agtaccaata gaagagggtg atactagcca taatactagc tataggttaa taagttgtaa 6060  
cacctcagtc attacacagg cctgtccaaa ggtatccttt gagccaattc ccatacatta 6120  
ctgtgccccg gctggttttg cgattctaaa atgtaatgat aaraaattta atggaacagg 6180  
atcatgtaaa aatgtcagta cagtacaatg tacacatgga attaaaccag tagtatcaac 6240  
tcaactgctg ttaaattggc gtctagcaga agaagagata gtaattagat ctgagaattt 6300  
cacgaacaat gctaaaacta taatagtaca gctgaataaa actatacaaa ttaattgtat 6360

aagacccaac aacaatacaa gaagagggtat acatatagga ccaggagag cattttatgg 6420

aacagacata ataggagat 6439

<210> 22

<211> 495

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 22

atgtcagaac cggctgggga tgtccgtcag aacccatgcg gcagcaaggc ctgccgccgc 60

ctcttcggcc cagtggacag cgagcagctg agacgcgact gtgatgcgct aatggcgggc 120

tgcattcagg aggcccgtga gcgatggaac ttcgactttg tcaccgagac accactggag 180

ggtgacttcg cctgggagcg tgtgcggggc cttggcctgc ccaagctcta ccttcccacg 240

gggccccggc gaggccggga tgagttggga ggaggcaggc ggcctggcac ctcacctgct 300

ctgctgcagg ggacagcaga ggaagacat gtggacctgt cactgtcttg tacccttgtg 360

cctcgctcag gggagcaggc tgaagggtcc ccagggtggac ctggagactc tcagggtcga 420

aaacggcggc agaccagcat gacagatttc taccactcca aacgccggct gatcttctcc 480

aagaggaagc cctaa 495

<210> 23

<211> 164

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 23

Met Ser Glu Pro Ala Gly Asp Val Arg Gln Asn Pro Cys Gly Ser Lys  
1 5 10 15

Ala Cys Arg Arg Leu Phe Gly Pro Val Asp Ser Glu Gln Leu Ser Arg  
20 25 30

Asp Cys Asp Ala Leu Met Ala Gly Cys Ile Gln Glu Ala Arg Glu Arg  
35 40 45

Trp Asn Phe Asp Phe Val Thr Glu Thr Pro Leu Glu Gly Asp Phe Ala  
 50 55 60

Trp Glu Arg Val Arg Gly Leu Gly Leu Pro Lys Leu Tyr Leu Pro Thr  
 65 70 75 80

Gly Pro Arg Arg Gly Arg Asp Glu Leu Gly Gly Gly Arg Arg Pro Gly  
 85 90 95

Thr Ser Pro Ala Leu Leu Gln Gly Thr Ala Glu Glu Asp His Val Asp  
 100 105 110

Leu Ser Leu Ser Cys Thr Leu Val Pro Arg Ser Gly Glu Gln Ala Glu  
 115 120 125

Gly Ser Pro Gly Gly Pro Gly Asp Ser Gln Gly Arg Lys Arg Arg Gln  
 130 135 140

Thr Ser Met Thr Asp Phe Tyr His Ser Lys Arg Arg Leu Ile Phe Ser  
 145 150 155 160

Lys Arg Lys Pro

<210> 24  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> substrate

<400> 24

Ala Lys Arg Arg Arg Leu Ser Ser Leu Arg Ala  
 1 5 10

<210> 25  
 <211> 72  
 <212> PRT  
 <213> Human adenovirus type 1

&lt;400&gt; 25

Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser  
1 5 10 15

Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Cys Lys Val Cys Cys Phe  
20 25 30

His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly  
35 40 45

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Ala Pro Gln Asp Ser Gln Thr  
50 55 60

His Gln Ala Pro Leu Pro Lys Gln  
65 70

&lt;210&gt; 26

&lt;211&gt; 3305

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Rattus norvegicus

&lt;400&gt; 26

```

gggccagcca gagagcgaga gagccggaga gagccagaga gagccagaga gagcgggtca      60
gctcccagct ccaagcagcg cagcgcccg cgggtctctc ccggccaccg ccgccaccac      120
cgctacctca gcaccgccac ctgggccgcc gccccgccc accccggccc tccccggctg      180
ctgctccccg gcggaggcaa gaggtggttg ggggggacca tggctgacgt ttaccggcc      240
aacgactcca cggcgtctca ggacgtggcc aaccgcttcg cccgcaaagg ggcgctgagg      300
cagaagaacg tgcattgaggt gaaagaccac aaattcatcg cccgcttctt caagcaaccc      360
accttctgca gccactgcac cgacttcac tgggggtttg gaaaacaagg cttccagtgc      420
caagtttgct gttttgtggt tcacaagagg tgccatgagt ttgttacttt ctcttgtccg      480
ggtgcggata agggacctga cactgatgac ccagaagca agcacaagtt caaaatccac      540
acctatggaa gccctacctt ctgtgatcac tgtgggtccc tgctctacgg acttatccac      600
caagggatga aatgcgacac ctgcgacatg aatgttcaca agcagtgcgt gatcaatgtc      660

```



cccagcctct gcggaatgga tcacacagag aagagggggc ggatttacct gaaggcagag 720  
gtcacagatg aaaagctgca cgtcaccgta cgagatgcaa aaaatctaata ccctatggat 780  
ccaaatgggc tttcggatcc ttacgtgaag ctgaaactta ttcctgaccc caagaatgag 840  
agcaaacaga aaaccaaacc catccgatcc aactgaacc ctacgtggaa tgagtccttc 900  
acgttcaaat taaaaccttc agacaaagac cggcgactgt ccgtagaaat ctgggactgg 960  
gatcggacga cacggaatga cttcatgggc tccctttcct tcggcgtctc agagctgatg 1020  
aagatgccag ccagtggatg gtacaagttg ctcaaccaag aggagggtga atactacaat 1080  
gtgcccattc cagaaggaga tgaagaaggc aacgtggaac tcaggcagaa gttcgagaaa 1140  
gccaaagctgg gccccgctgg aaacaaagtc atcagccctt cagaagacag gaagcagcca 1200  
tctaacaacc tggacagggt gaaactcaca gacttcaact tcctcatggt gctggggaag 1260  
gggagttttg gaaaggtgat gcttgctgac aggaaggga cagaggaact gtacgccatc 1320  
aaaatcctga agaaggacgt ggtgatccag gatgacgacg tggagtgcac catggtggag 1380  
aagcgggttc tggccctgct cgacaagccc ccgttcctga cacagctgca ctctgcttc 1440  
cagacagtgg accggctgta cttcgtcatg gaatacgtca acggtgggga cctcatgtac 1500  
cacattcagc aagtcggaaa atttaaggag ccacaagcag tattctatgc agccgagatc 1560  
tccatcggac tgttctttct tcacaaaaga ggaatcattt acagggatct gaagctggac 1620  
aacgtcatgc tggactcaga agggcatatc aaaatcgccg acttcgggat gtgcaaggaa 1680  
cacatgatgg acgggggtcac gaccaggacc ttctgtggga ctccggatta cattgcccc 1740  
gagataatcg cttaccagcc atatggaaag tctgtggact ggtgggcgta cggcgtgctc 1800  
ctgtatgaga tgctagctgg gcagcctccg ttcgatggcg aagacgaaga tgaactgttt 1860  
cagtctataa tggagcaca tgtgtcctac cccaaatcct tgtccaagga agctgtctcc 1920  
atctgcaaag ggcttatgac caaacacctt gccaaagcggc tgggctgcgg gcccgagggg 1980  
gaaagggatg tcagagagca tgccttcttt aggaggatcg actgggagaa gttggagAAC 2040  
agggagatcc aaccgccatt caagcccaaa gtgtgcggca aaggagcaga aaactttgac 2100  
aagttcttca cacgagggca gcctgtctta acaccaccag atcagctggt catcgctaac 2160

atagaccagt ctgattttga agggttctcg tatgtcaacc cccagtttgt gcaccaatc 2220  
 ttgcaaagtg cagtatgaaa ctgagaaaca aaagatctaa tgcctcccta gcccccaatc 2280  
 tccccagcag ttgggaagtg attcttaacc ataaaatttt aaggctatag ccttgtattt 2340  
 tgttccacac agaggcctga aaattctggg gatattagtc cataagtgat caactttctt 2400  
 cccccacca atcccaaacc aaaaaacatt atcttagtgg atgatgacat aatatacaga 2460  
 gtatagttta attatgtaga agtcacatct ggcttcaagt taattctttc ttaggaaaca 2520  
 aagagacttg gaccctatit tttggtacga tttaatatat tctccatacc tttcatattt 2580  
 tggattttca ctatccaaat caccagagat aataaagtga acccacctga actcaaggga 2640  
 tggaaacatt tctgcccag atatctttgg aattaaagaa caggaagccc aaacagaaaa 2700  
 caaagagagg cagagtctca tatattcaag acctcgttgc ttctattttc tgcttcaatg 2760  
 gaaacagtcc ctagagtctg agagggcagg atgaacctga tcaactgttc caatcatcat 2820  
 agcacaacca tagtgcatag ttgaaaaatg aaagaaaact tcagacagat gttcgttgaa 2880  
 tctatcatat gtactcccct gctcggttga taactatctc gataactcat tctttttaag 2940  
 aggccaaaat catctaagga ctttgctaaa caaacatgtg aaatcatttc agatcaagga 3000  
 taaaccatgt gtatgttcat tttaatctct gggagatgac tcttcaatcc aggggtgccat 3060  
 cagtaatcat gccactgttc acgagtgttg ttagccaacc ccccgccaca taataatatt 3120  
 ttgctacctt tgtgggtacc cticctagga agctaaaatg tatgccccat ccccttttgt 3180  
 actacttatt taataagccg cagtgtcgtt tatgaaagta caatgtatag taacttaatc 3240  
 aaaagtactg actagcatca gtccttatag gttgattttc ctcctttctc tagccccaca 3300  
 tccac 3305

<210> 27

<211> 672

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 27

Met Ala Asp Val Tyr Pro Ala Asn Asp Ser Thr Ala Ser Gln Asp Val

出証特 2 0 0 4 - 3 0 3 7 4 1 2



Lys Gln Lys Thr Lys Thr Ile Arg Ser Thr Leu Asn Pro Gln Trp Asn  
210 215 220

Glu Ser Phe Thr Phe Lys Leu Lys Pro Ser Asp Lys Asp Arg Arg Leu  
225 230 235 240

Ser Val Glu Ile Trp Asp Trp Asp Arg Thr Thr Arg Asn Asp Phe Met  
245 250 255

Gly Ser Leu Ser Phe Gly Val Ser Glu Leu Met Lys Met Pro Ala Ser  
260 265 270

Gly Trp Tyr Lys Leu Leu Asn Gln Glu Glu Gly Glu Tyr Tyr Asn Val  
275 280 285

Pro Ile Pro Glu Gly Asp Glu Glu Gly Asn Val Glu Leu Arg Gln Lys  
290 295 300

Phe Glu Lys Ala Lys Leu Gly Pro Ala Gly Asn Lys Val Ile Ser Pro  
305 310 315 320

Ser Glu Asp Arg Lys Gln Pro Ser Asn Asn Leu Asp Arg Val Lys Leu  
325 330 335

Thr Asp Phe Asn Phe Leu Met Val Leu Gly Lys Gly Ser Phe Gly Lys  
340 345 350

Val Met Leu Ala Asp Arg Lys Gly Thr Glu Glu Leu Tyr Ala Ile Lys  
355 360 365

Ile Leu Lys Lys Asp Val Val Ile Gln Asp Asp Asp Val Glu Cys Thr  
370 375 380

Met Val Glu Lys Arg Val Leu Ala Leu Leu Asp Lys Pro Pro Phe Leu  
385 390 395 400

Thr Gln Leu His Ser Cys Phe Gln Thr Val Asp Arg Leu Tyr Phe Val

405

410

415

Met Glu Tyr Val Asn Gly Gly Asp Leu Met Tyr His Ile Gln Gln Val  
 420 425 430

Gly Lys Phe Lys Glu Pro Gln Ala Val Phe Tyr Ala Ala Glu Ile Ser  
 435 440 445

Ile Gly Leu Phe Phe Leu His Lys Arg Gly Ile Ile Tyr Arg Asp Leu  
 450 455 460

Lys Leu Asp Asn Val Met Leu Asp Ser Glu Gly His Ile Lys Ile Ala  
 465 470 475 480

Asp Phe Gly Met Cys Lys Glu His Met Met Asp Gly Val Thr Thr Arg  
 485 490 495

Thr Phe Cys Gly Thr Pro Asp Tyr Ile Ala Pro Glu Ile Ile Ala Tyr  
 500 505 510

Gln Pro Tyr Gly Lys Ser Val Asp Trp Trp Ala Tyr Gly Val Leu Leu  
 515 520 525

Tyr Glu Met Leu Ala Gly Gln Pro Pro Phe Asp Gly Glu Asp Glu Asp  
 530 535 540

Glu Leu Phe Gln Ser Ile Met Glu His Asn Val Ser Tyr Pro Lys Ser  
 545 550 555 560

Leu Ser Lys Glu Ala Val Ser Ile Cys Lys Gly Leu Met Thr Lys His  
 565 570 575

Pro Ala Lys Arg Leu Gly Cys Gly Pro Glu Gly Glu Arg Asp Val Arg  
 580 585 590

Glu His Ala Phe Phe Arg Arg Ile Asp Trp Glu Lys Leu Glu Asn Arg  
 595 600 605

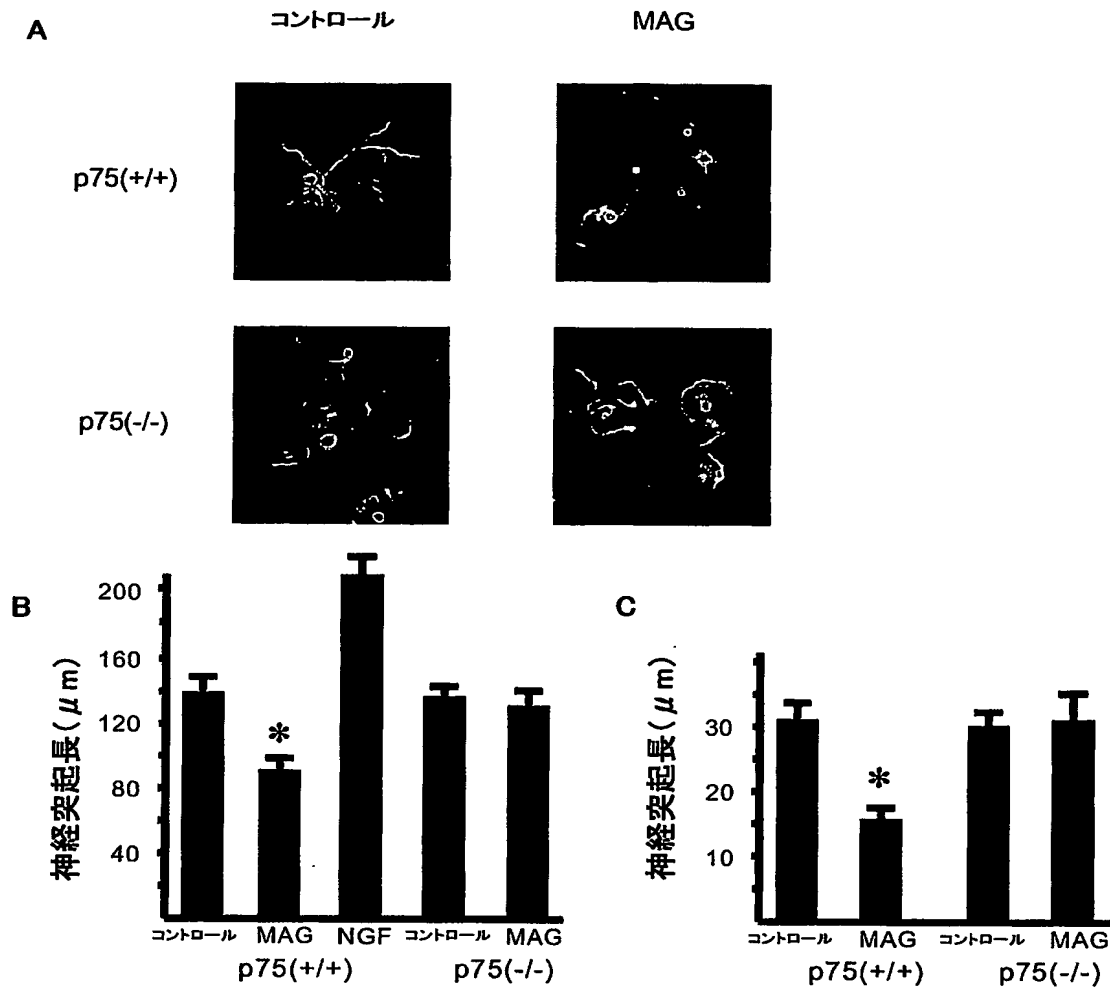
Glu Ile Gln Pro Pro Phe Lys Pro Lys Val Cys Gly Lys Gly Ala Glu  
610 615 620

Asn Phe Asp Lys Phe Phe Thr Arg Gly Gln Pro Val Leu Thr Pro Pro  
625 630 635 640

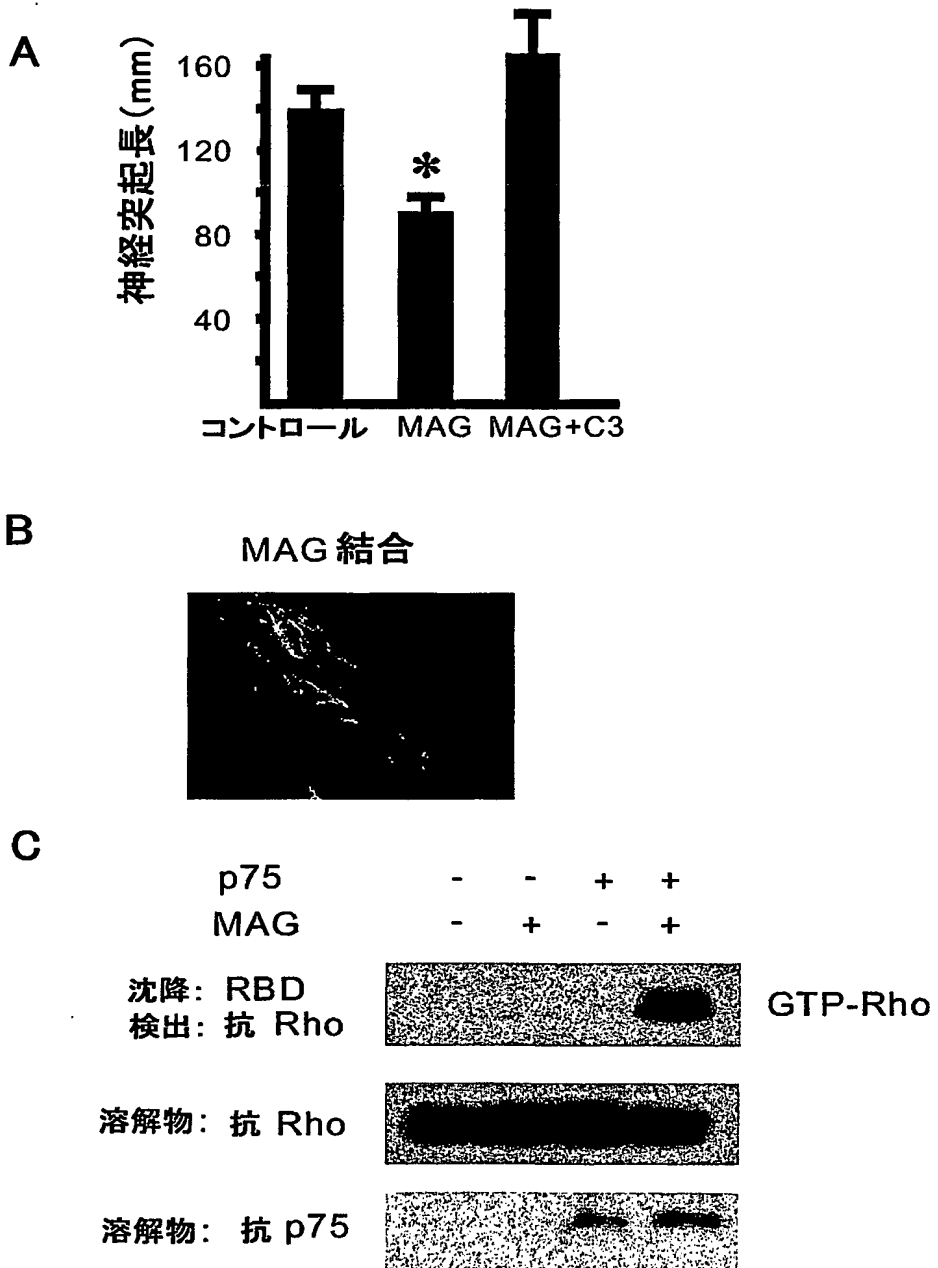
Asp Gln Leu Val Ile Ala Asn Ile Asp Gln Ser Asp Phe Glu Gly Phe  
645 650 655

Ser Tyr Val Asn Pro Gln Phe Val His Pro Ile Leu Gln Ser Ala Val  
660 665 670

【書類名】 図面  
【図 1】

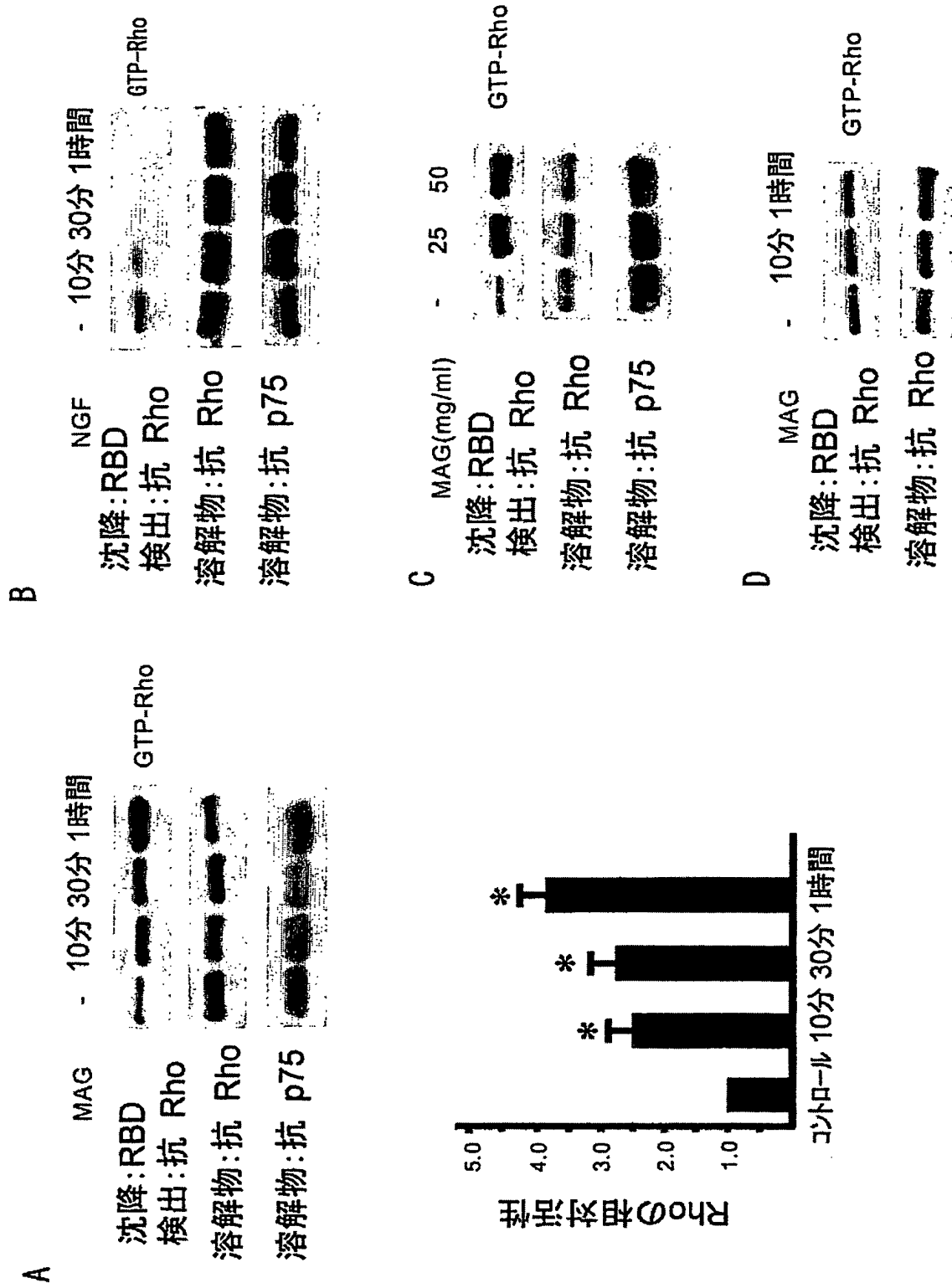


【図 2】



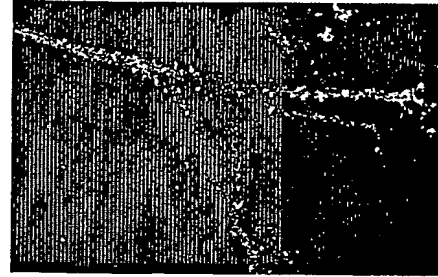
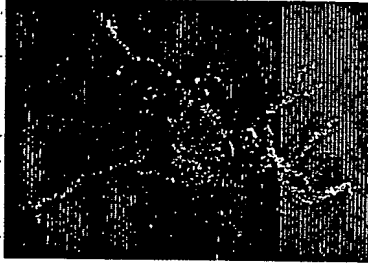
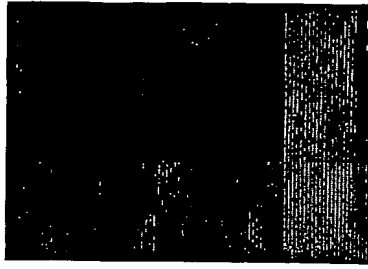


【図3】

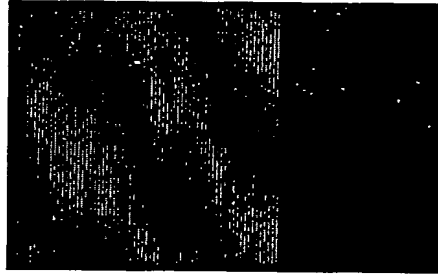
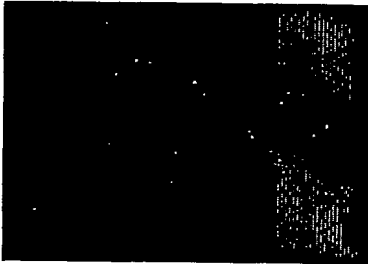


【図 4】

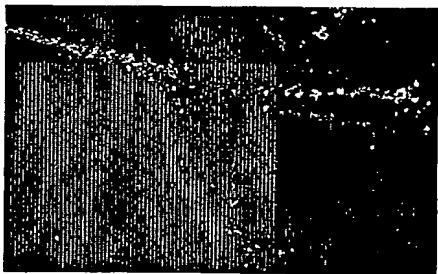
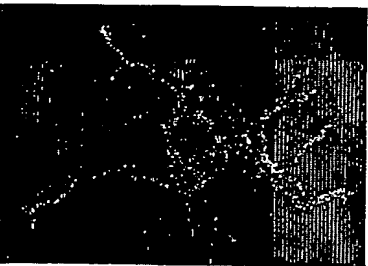
重ね合わせ B MAG 結合



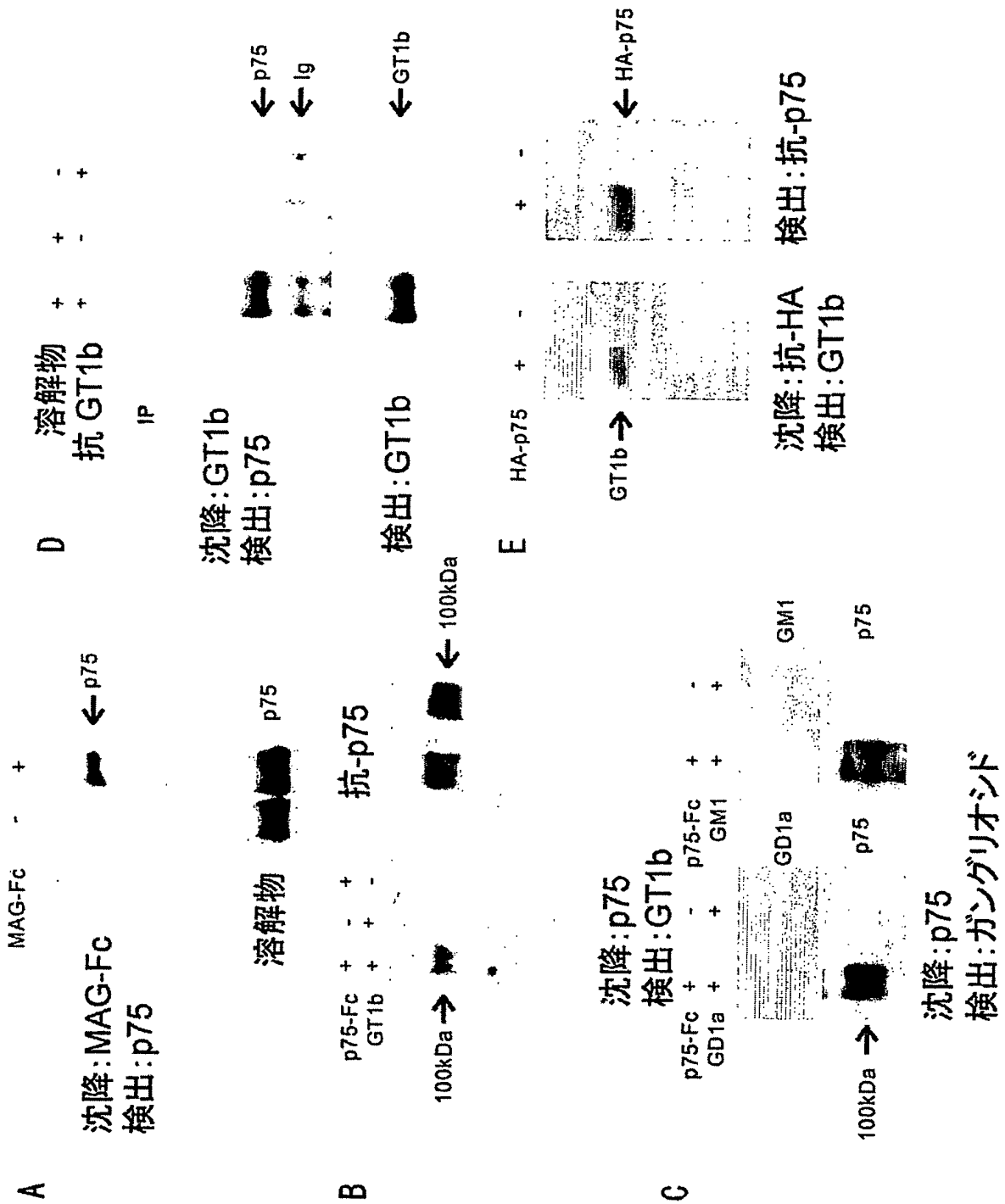
MAG 結合



A p75<sup>NTR</sup>



【図5】



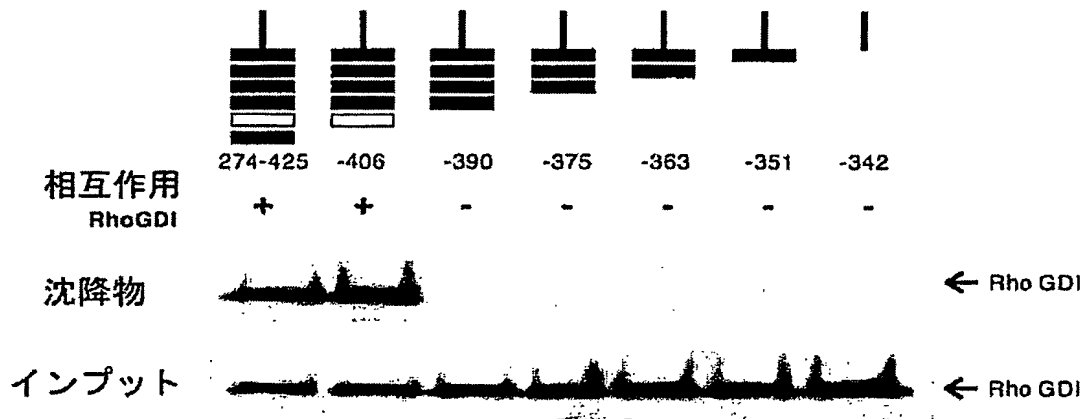


【図 7】

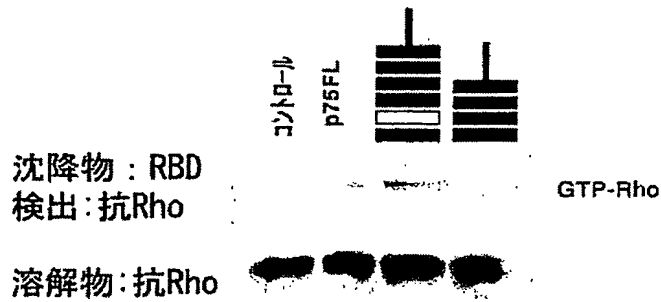
A



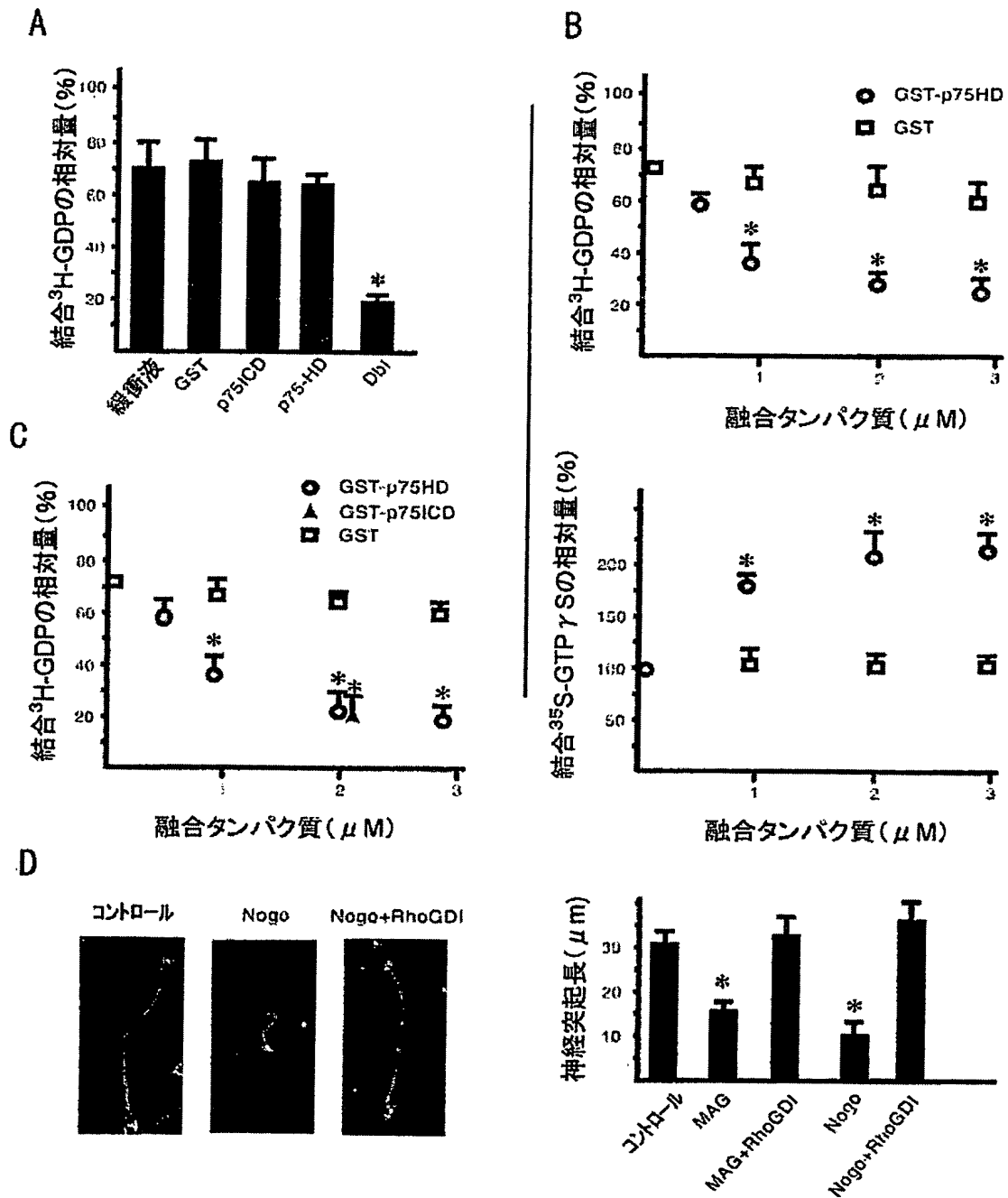
B



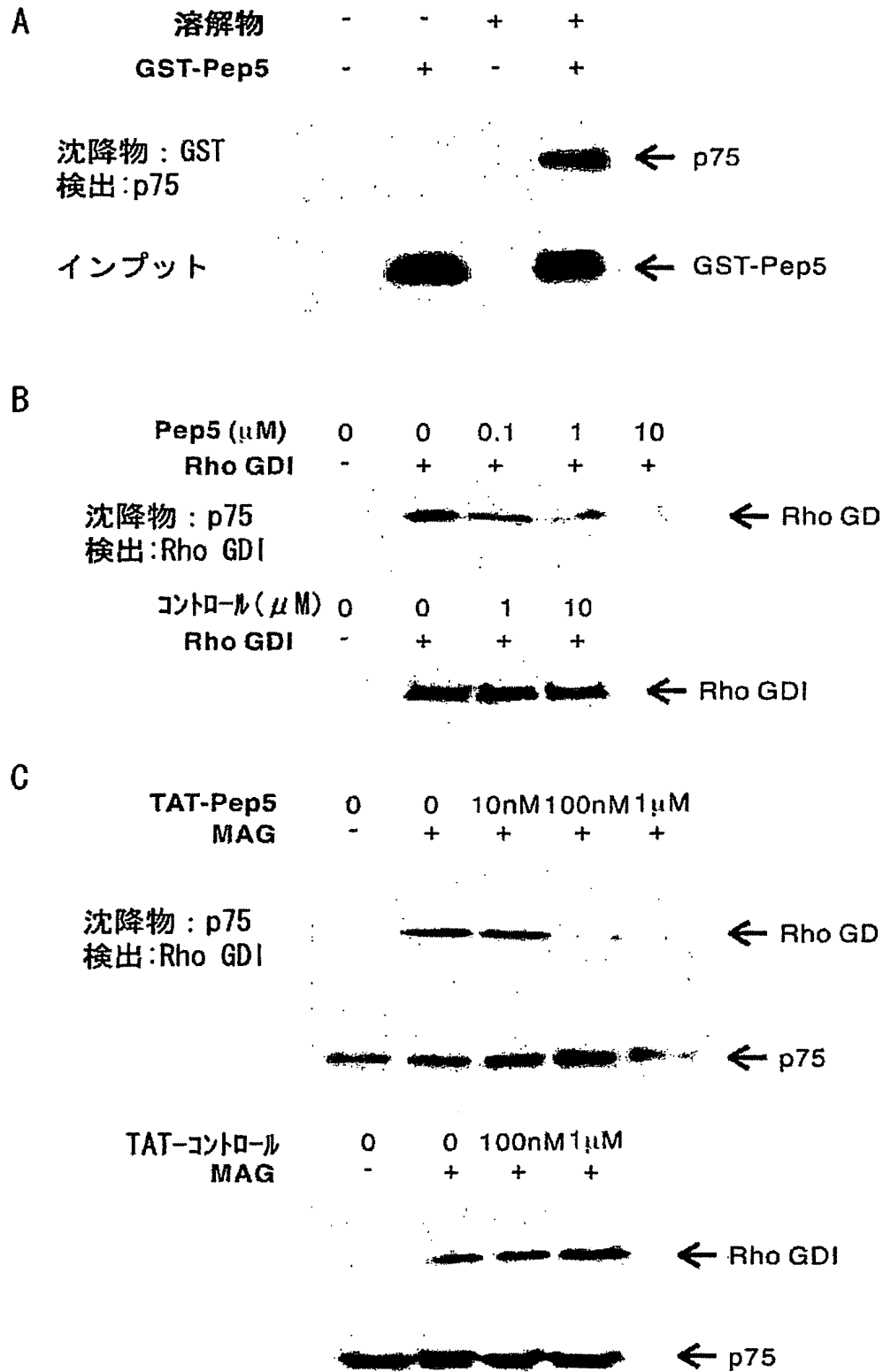
C



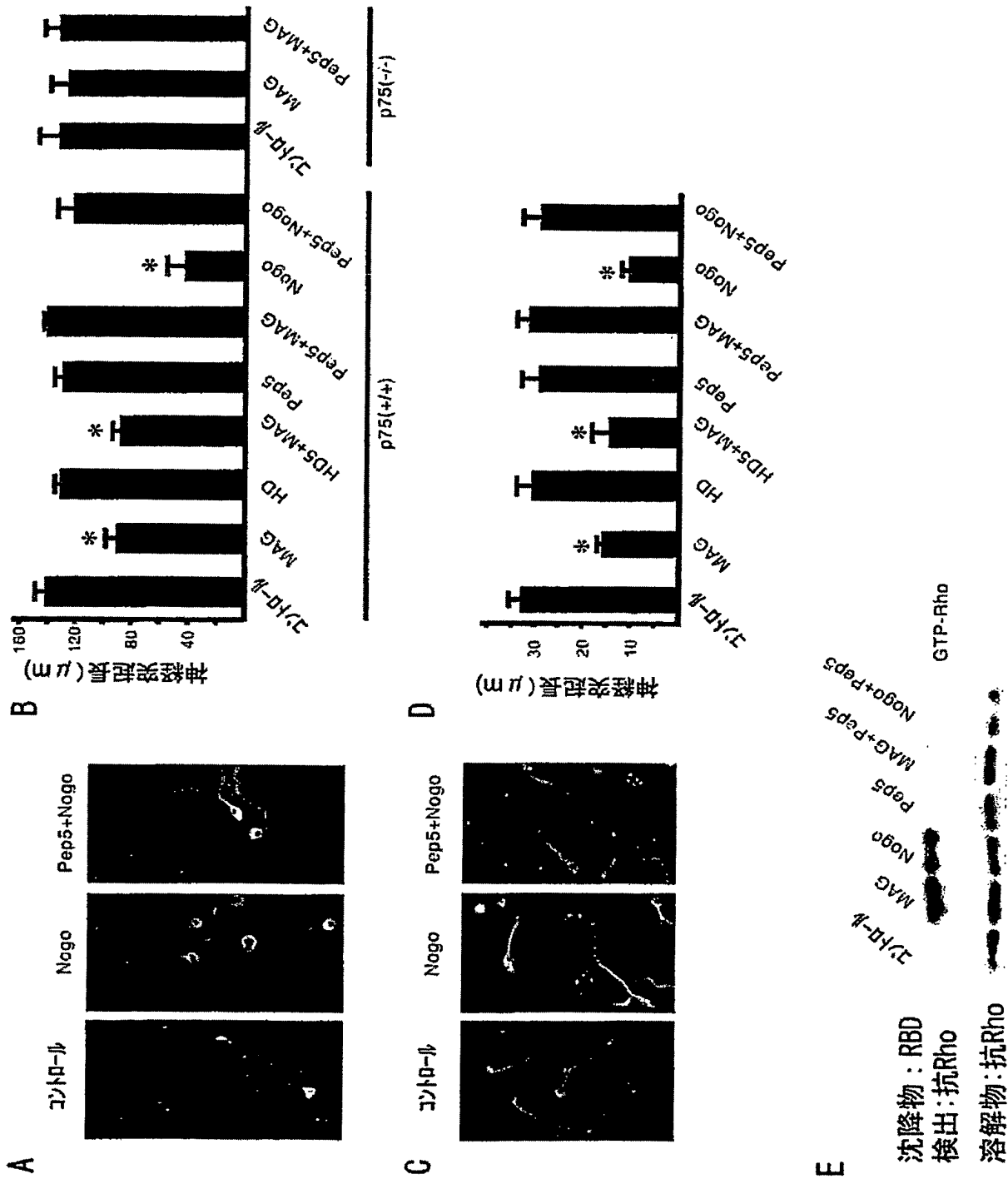
【図 8】



【図 9】

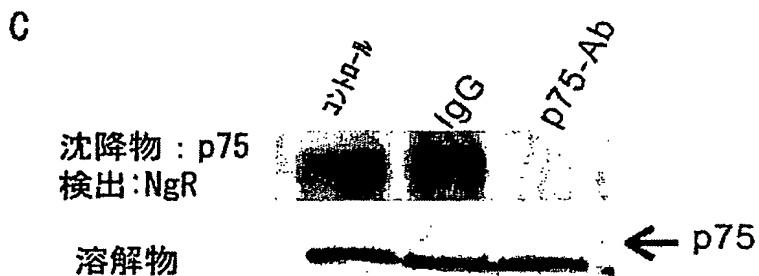
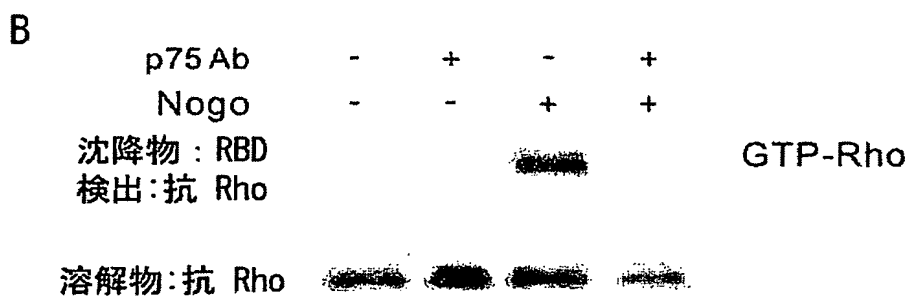
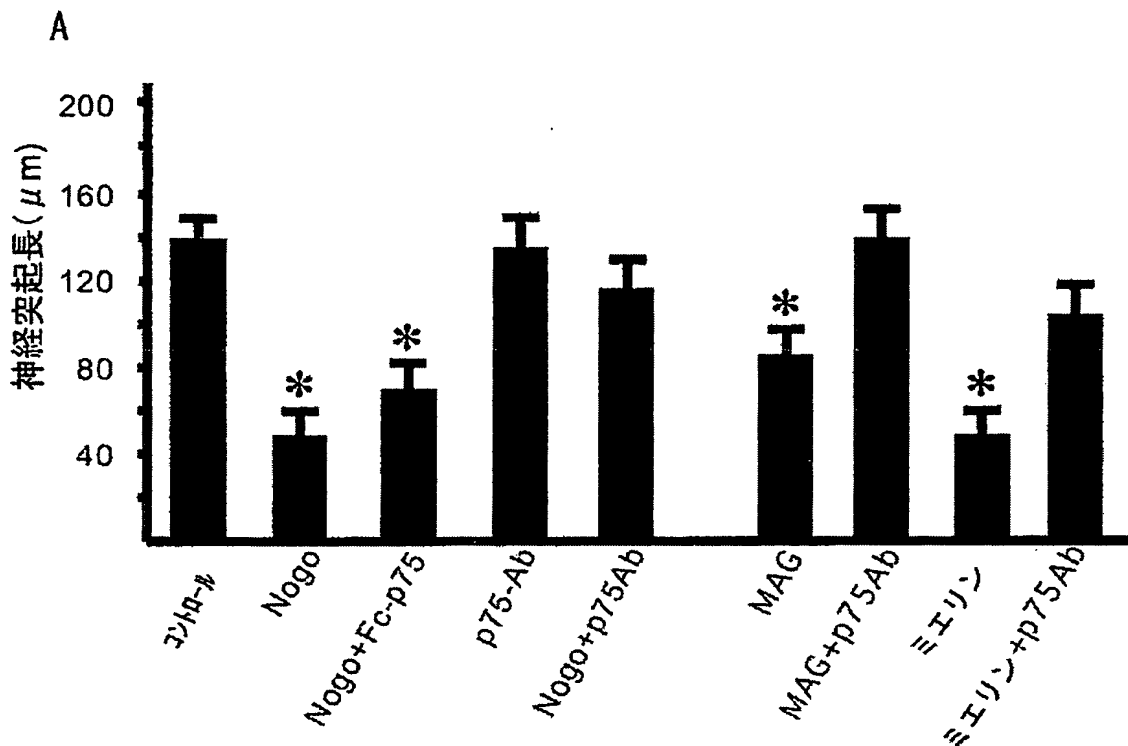


【図 10】

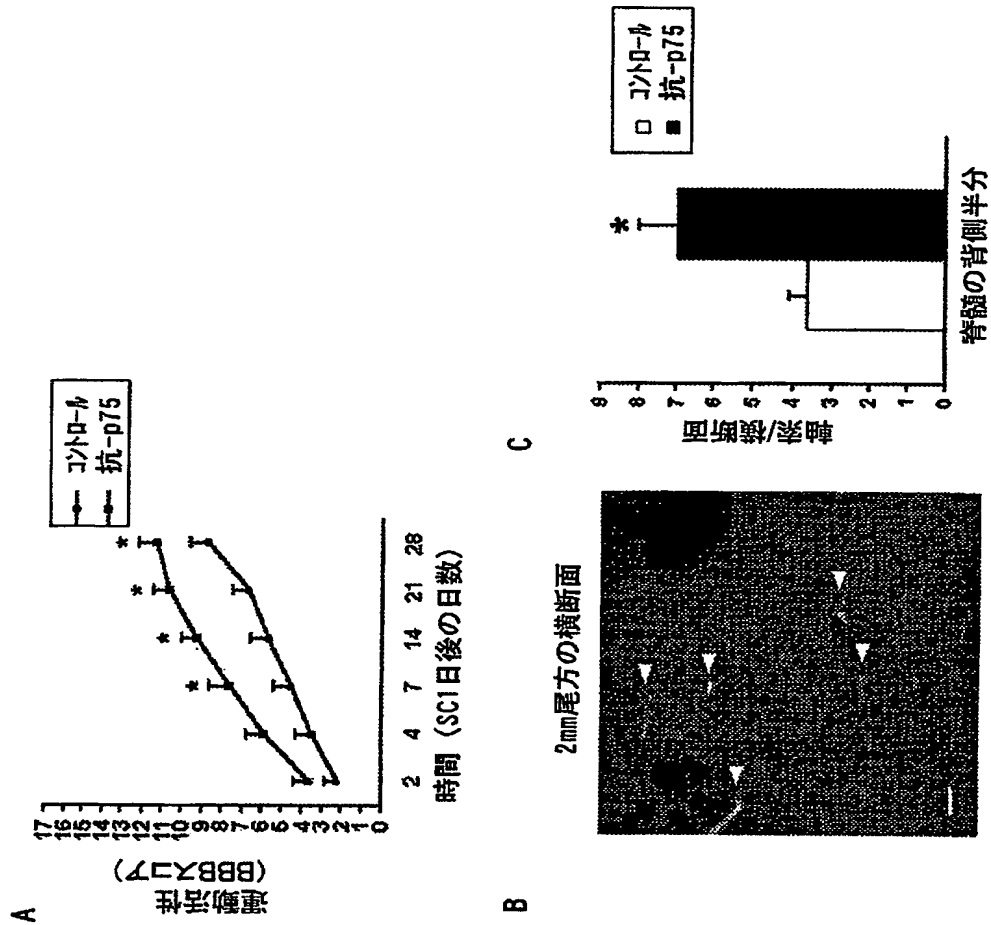




【図 11】



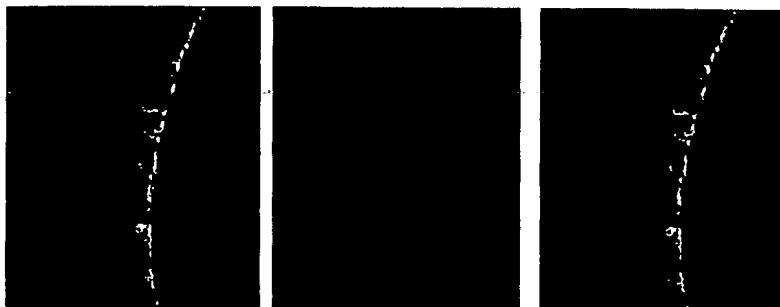
【図 1 2】



【図 13】

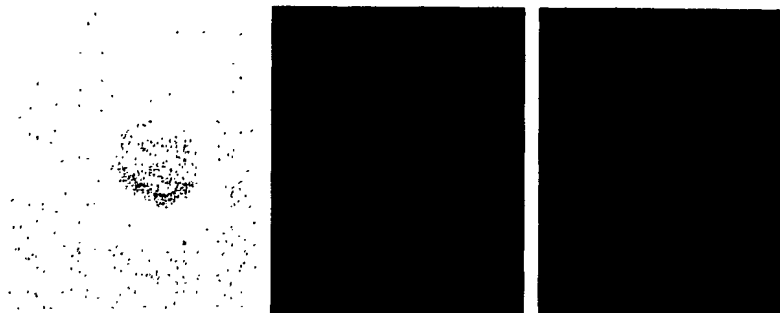
A

$\beta$ -チューブリン p21<sup>Cip1/WAF1</sup> 重ね合わせ

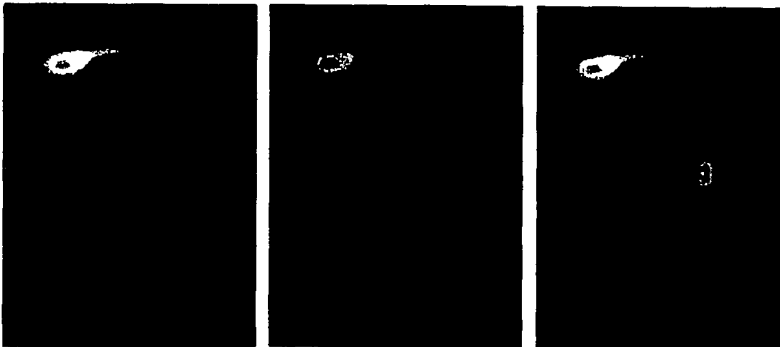


B

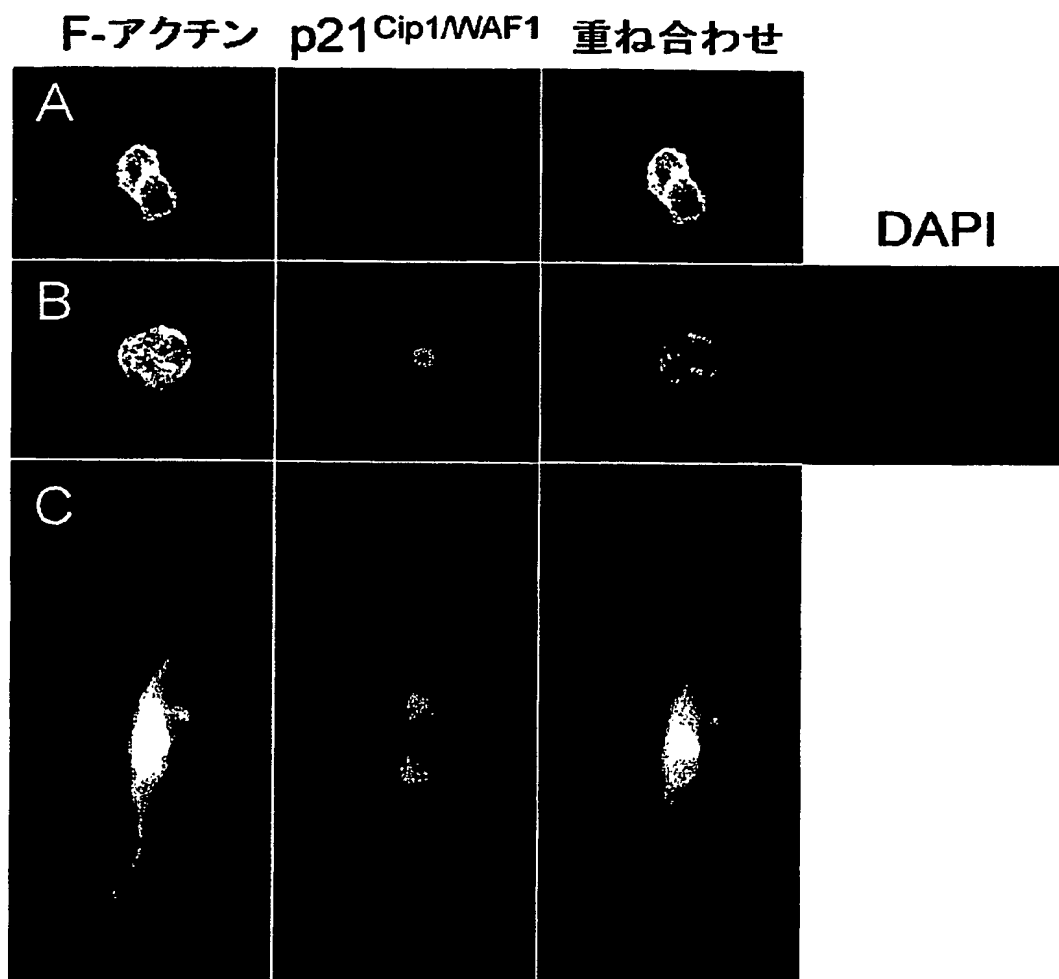
p21<sup>Cip1/WAF1</sup> DAPI



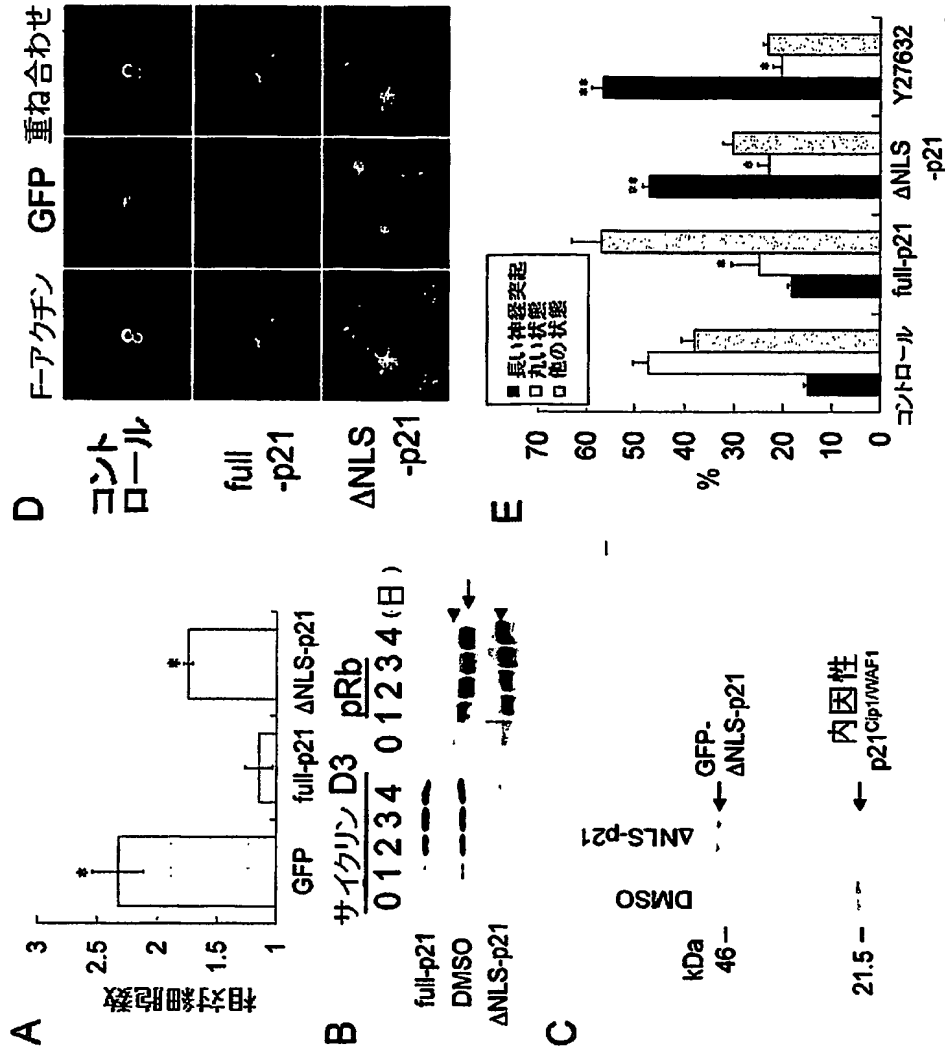
$\beta$ -チューブリン p21<sup>Cip1/WAF1</sup> 重ね合わせ



【図 14】



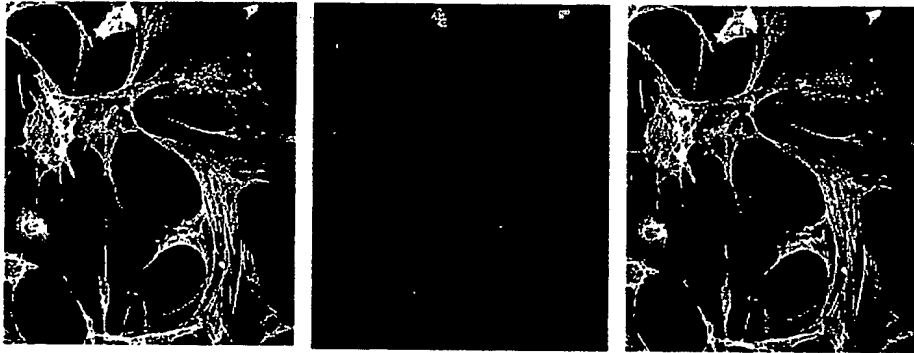
【図 15】



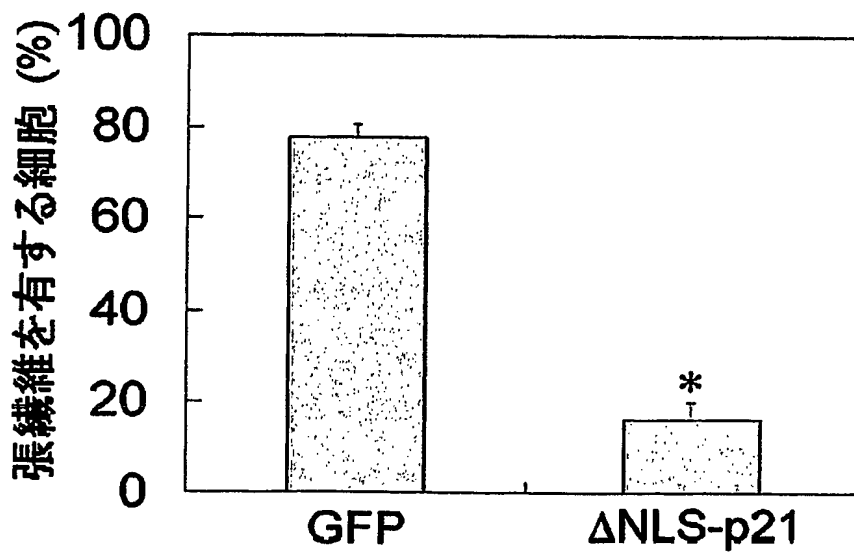
【図16】

A

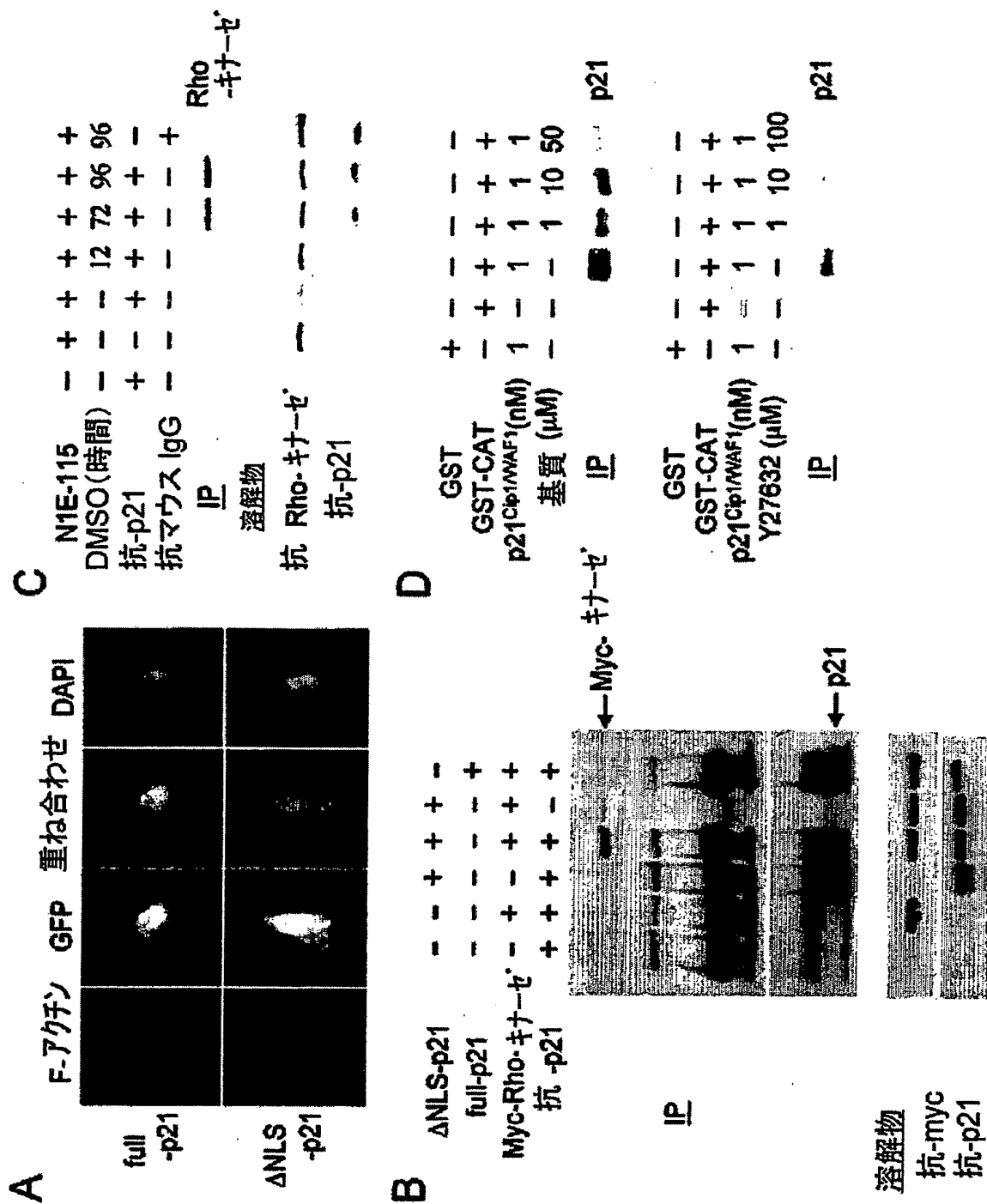
F-アクチン p21<sup>Cip1/WAF1</sup> 重ね合わせ



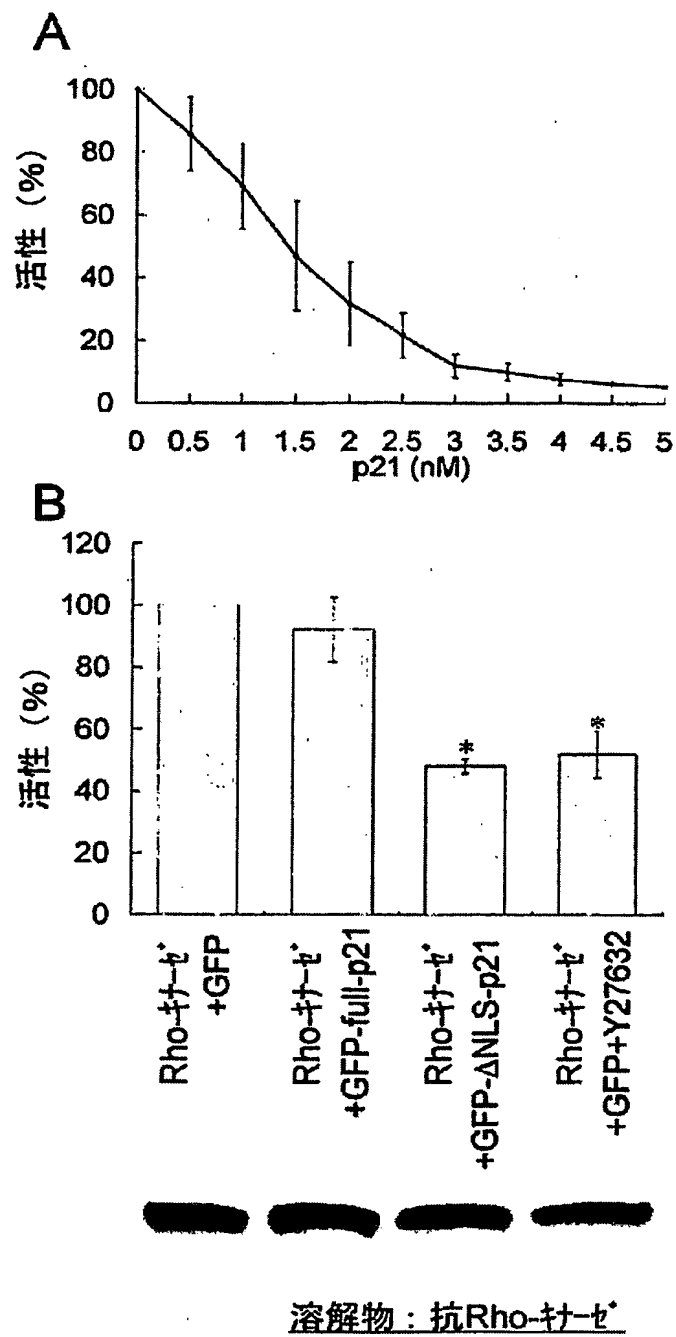
B



【図 17】

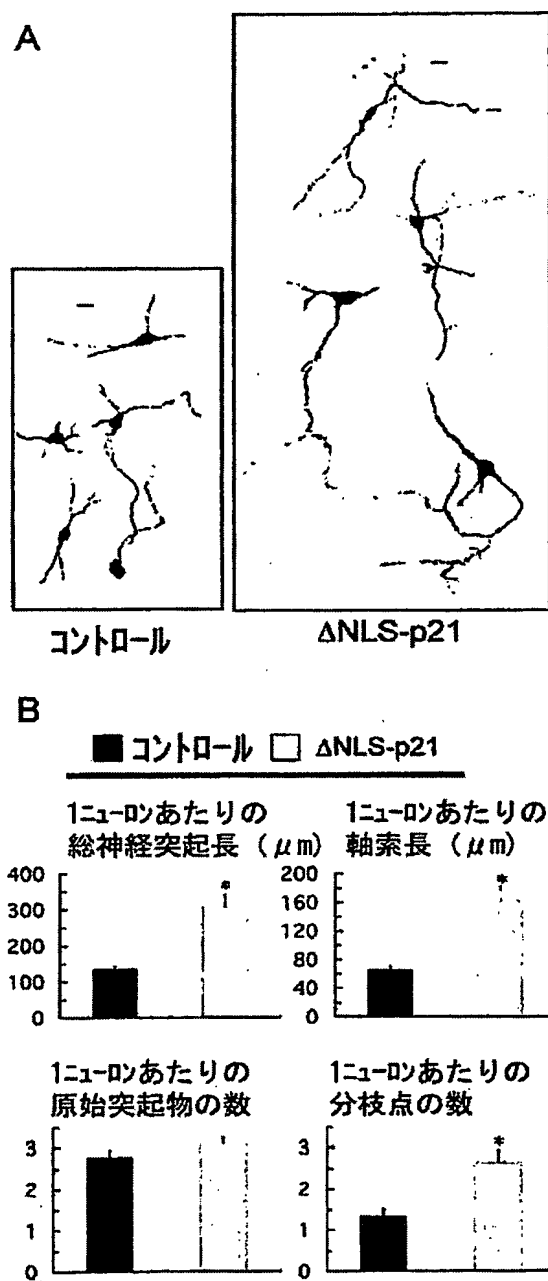


【図18】





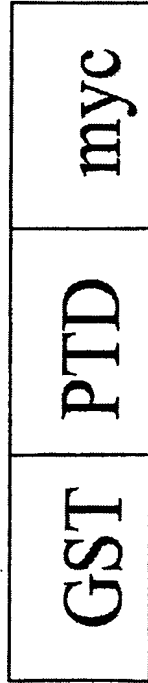
【図 19】



【図 20】

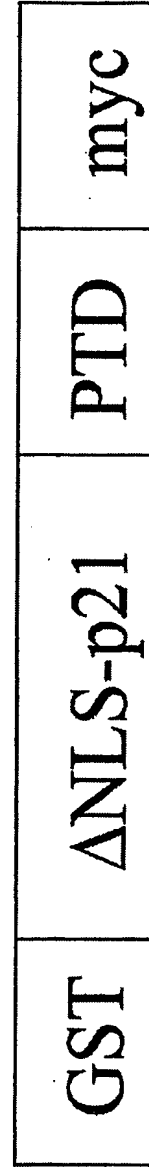
TAT結合タンパク質の構造

コントロールタンパク質



(30.7kDa)

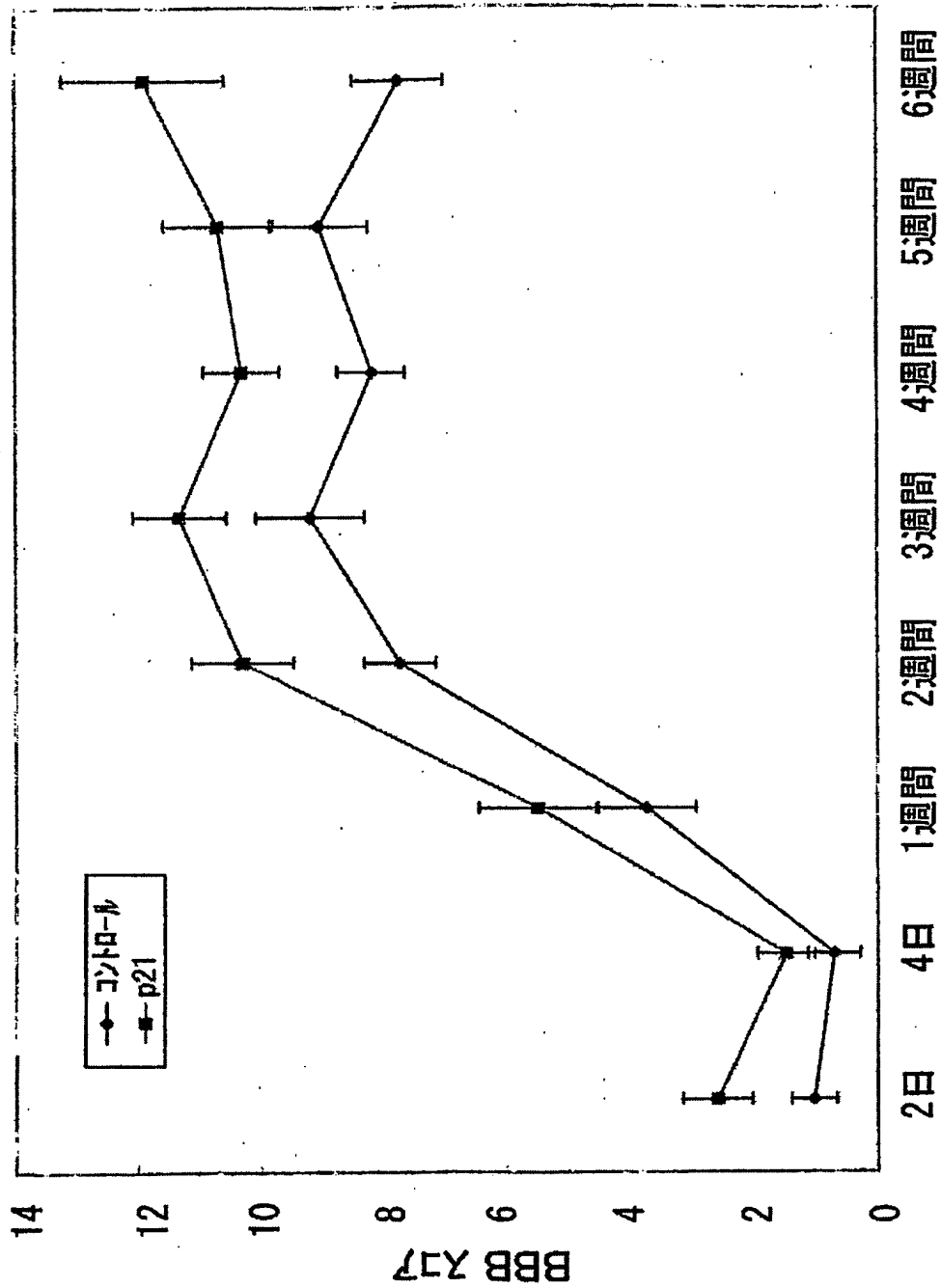
GST-ΔNLS-p21-PTD-myc タンパク質



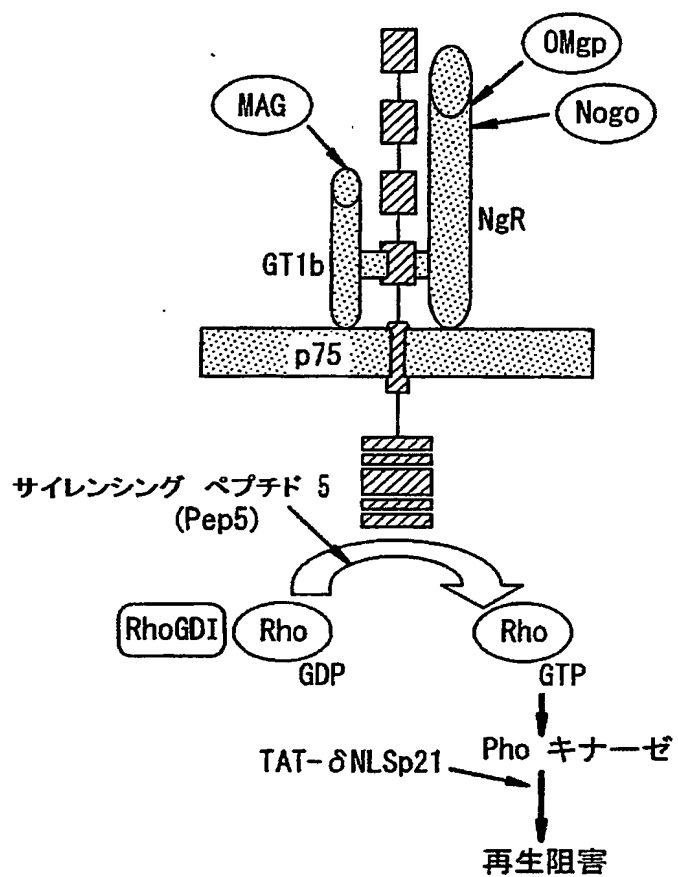
(44.1kDa)

タンパク質導入ドメイン  
YARAAARQARA

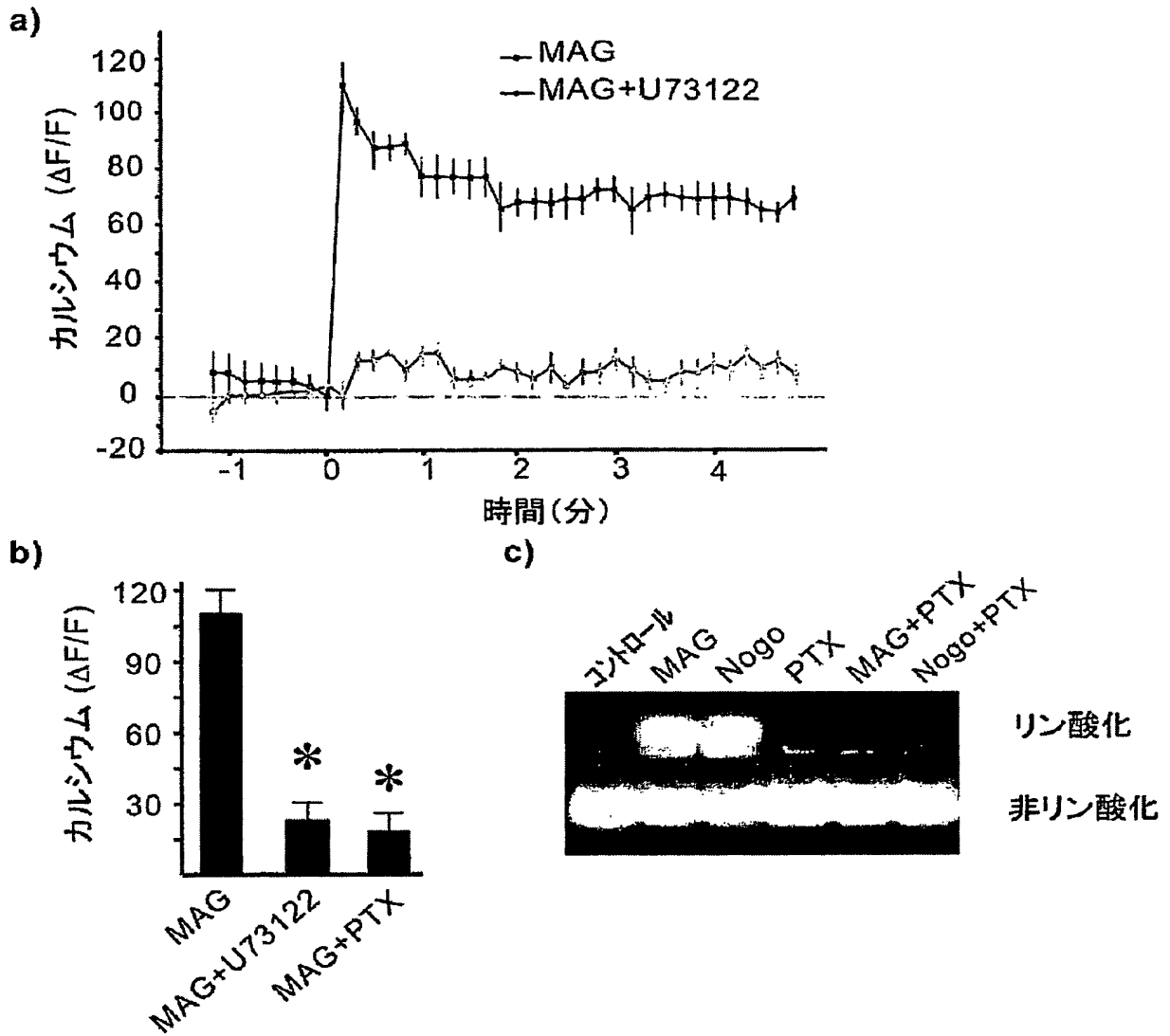
【図21】



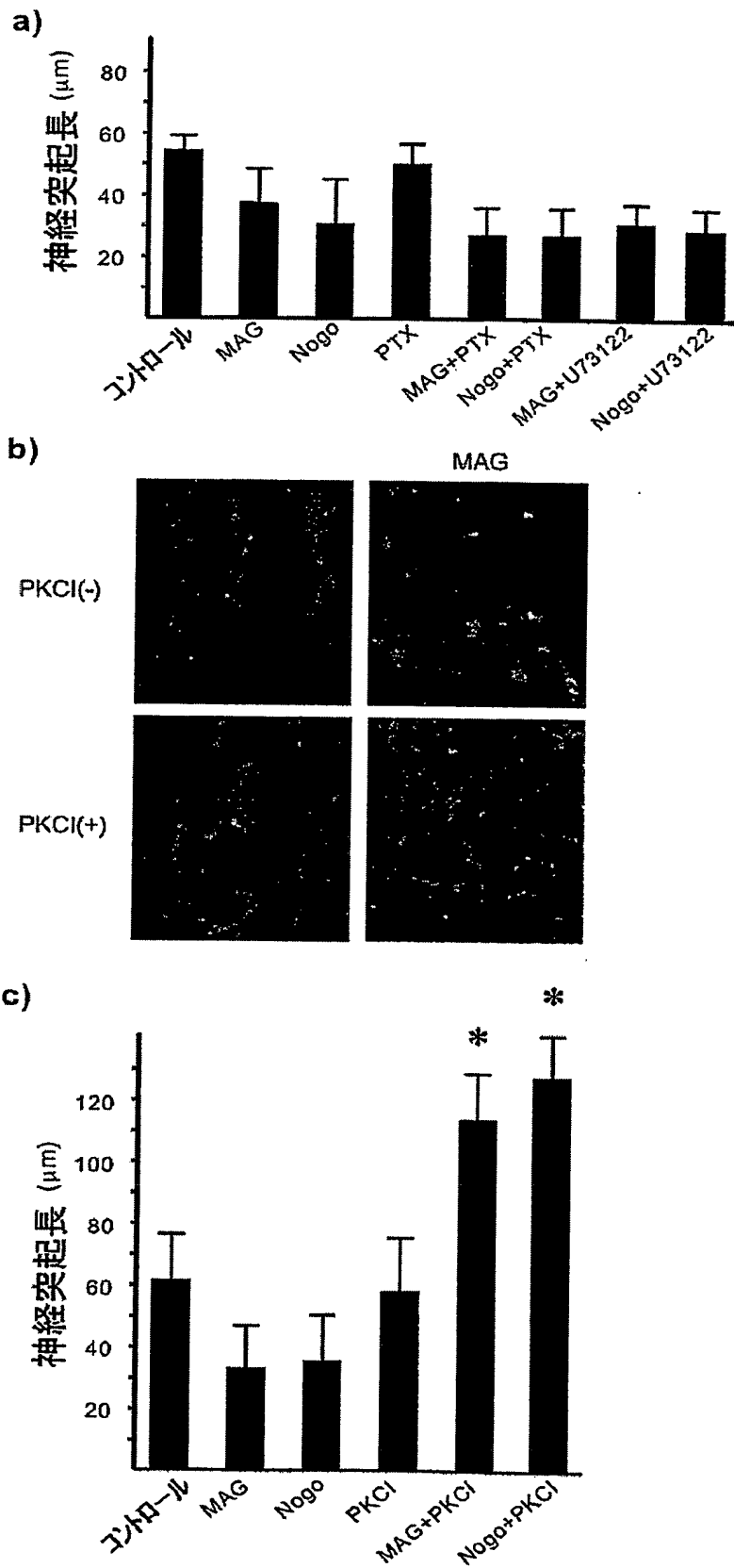
【図 22】



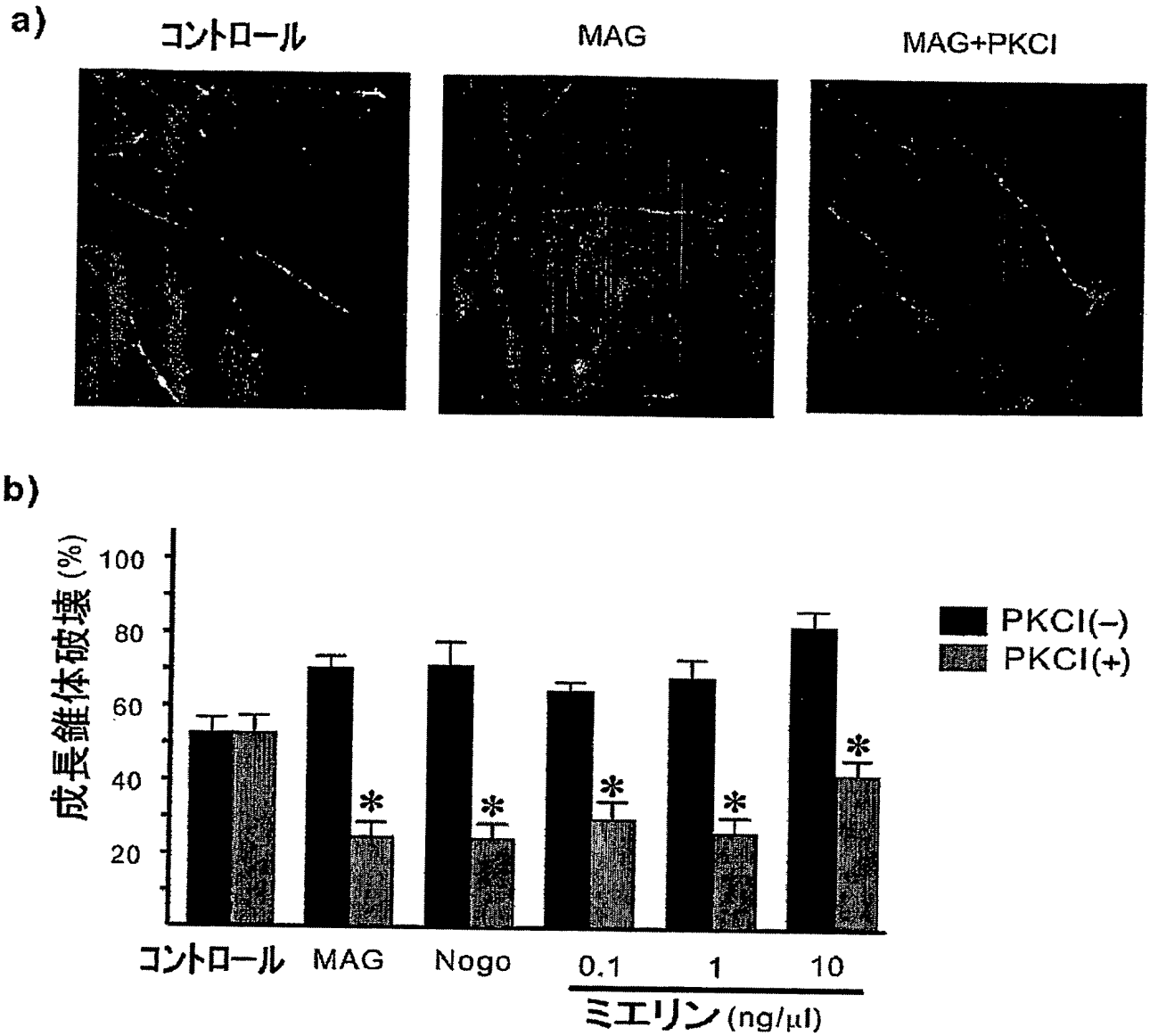
【図 23】



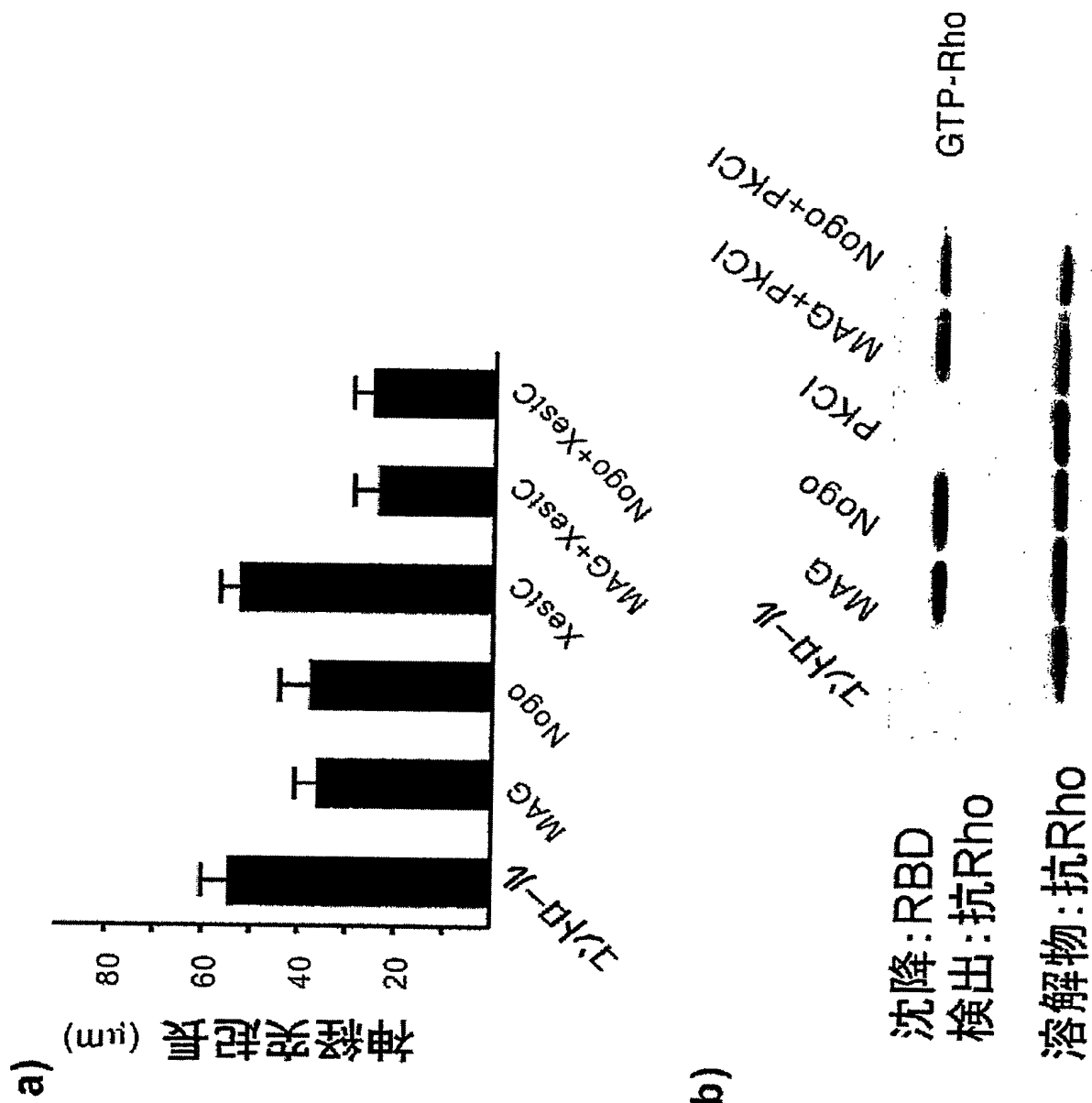
【図 24】



【図 25】

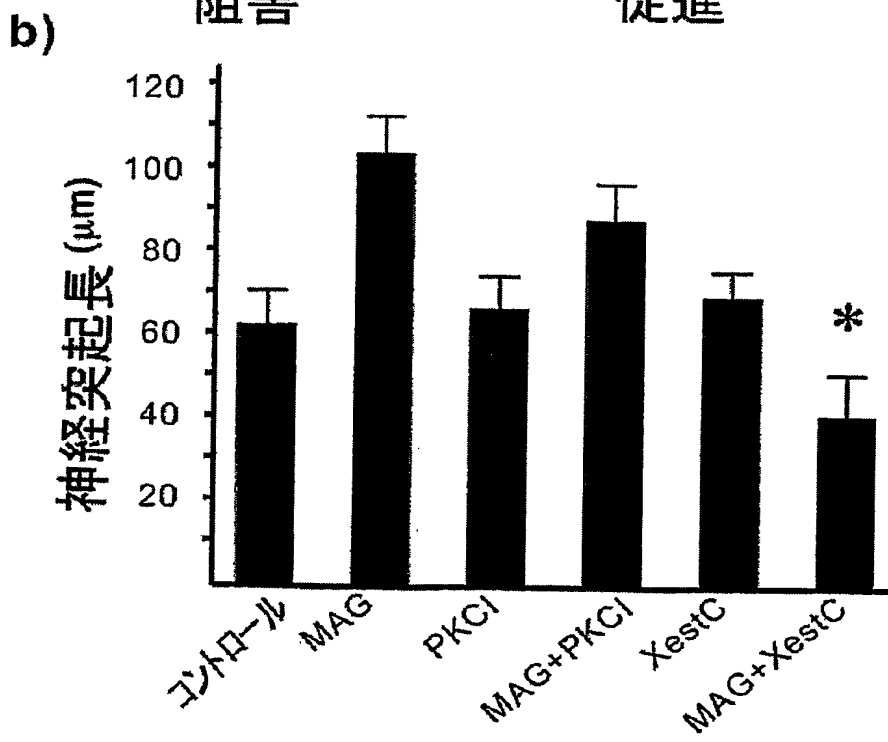
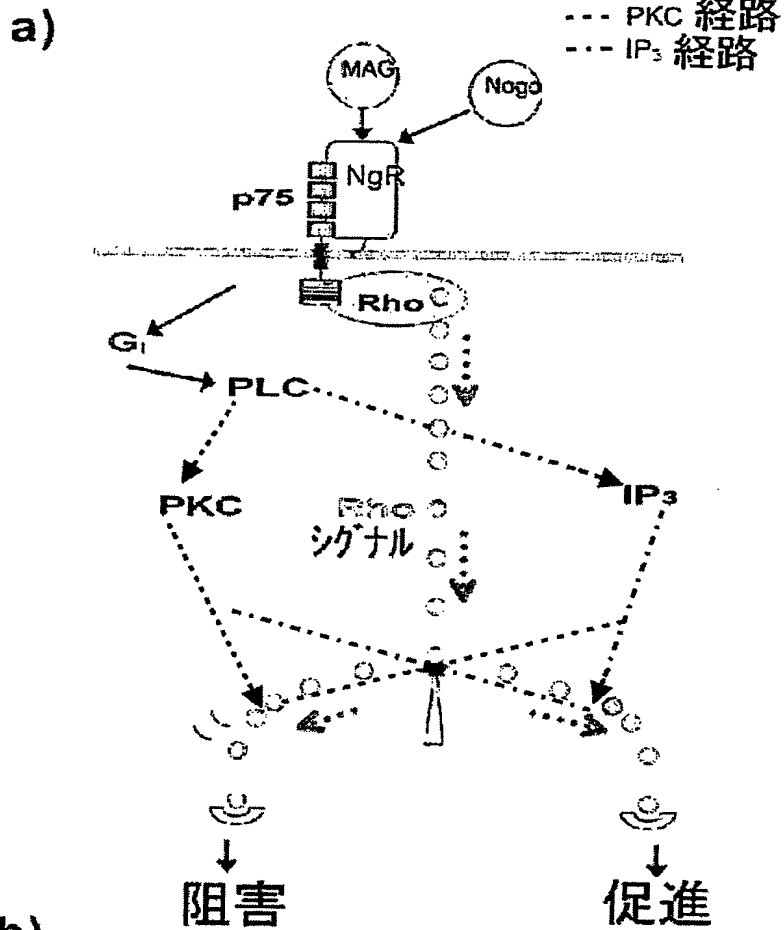


【図 26】





【図 27】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】

神経の再生およびその神経の再生に基づいて神経学的疾患を処置するための薬学的組成物および方法を提供すること。

【解決手段】

上記課題は、p75シグナル伝達経路に関与するPep5、PKC、IP<sub>3</sub>、p75、Rho、Rho GDI、MAG、GTP、p21、Rhoキナーゼなどの組成物またはそれに特異的に相互作用する因子を用いることによって、p75シグナル伝達経路を遮断または抑制することによって、再生障害がストップすることにより再生が再開することによって解決された。本発明はまた、PTDドメインが神経再生薬において有用であることを初めて開示する。

【選択図】 なし

【書類名】 出願人名義変更届  
【整理番号】 J103573332  
【提出日】 平成15年12月 8日  
【あて先】 特許庁長官殿  
【事件の表示】  
    【出願番号】 特願2003-284559  
【承継人】  
    【識別番号】 503328506  
    【氏名又は名称】 株式会社インテレクチャル・プロパティ・コンサルティング  
【承継人代理人】  
    【識別番号】 100078282  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 山本 秀策  
【手数料の表示】  
    【予納台帳番号】 001878  
    【納付金額】 4,200円  
【提出物件の目録】  
    【物件名】 委任状 1  
    【援用の表示】 平成15年12月8日付で提出の包括委任状を援用する。

## 認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2003-284559
受付番号	50302021814
書類名	出願人名義変更届
担当官	笹川 友子 9482
作成日	平成16年 2月 6日

## &lt;認定情報・付加情報&gt;

## 【承継人】

【識別番号】	503328506
【住所又は居所】	東京都千代田区内幸町1丁目1番1号
【氏名又は名称】	株式会社インテレクチャル・プロパティ・コンサルティング

## 【承継人代理人】

申請人

【識別番号】	100078282
【住所又は居所】	大阪府中央区城見1丁目2番27号 クリスタル タワー15階
【氏名又は名称】	山本 秀策

特願 2 0 0 3 - 2 8 4 5 5 9

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[ 3 0 2 0 4 4 5 4 6 ]

1. 変更年月日

2 0 0 3 年 7 月 1 6 日

[変更理由]

住所変更

住 所

東京都千代田区内幸町 1 丁目 1 番 1 号 インペリアルタワー 6 階

氏 名

株式会社トランスサイエンス

特願 2 0 0 3 - 2 8 4 5 5 9

ページ： 2/E

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[ 5 0 3 3 2 8 5 0 6 ]

1. 変更年月日

2 0 0 3 年 9 月 8 日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都千代田区内幸町 1 丁目 1 番 1 号

氏 名

株式会社インテレクチャル・プロパティ・コンサルティング

This Page is inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record

## BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ BLACK BORDERS
- ☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLORED OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REPERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images  
problems checked, please do not report the  
problems to the IFW Image Problem Mailbox**